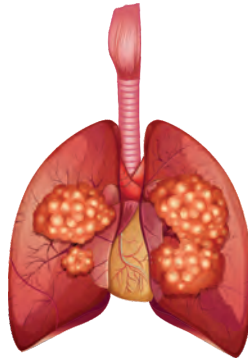


Die Wirkung von Endotoxin auf die  
Ansprache auf Strahlentherapie im  
nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Die Wirkung von Endotoxin auf die  
Ansprache auf Strahlentherapie im  
nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Schütz, Elena**

aus Gießen

Gießen 2019

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Schäffler,  
und aus der Medizinischen Klinik IV und V,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. F. Grimminger,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Grandel
2. Gutachter: Prof. Dr. Rita Engenhart-Cabillic

Tag der Disputation: 27.02.2020

# Inhaltsverzeichnis

|            |                                                                                                                             |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>                                                                                                     | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>DAS LUNGENKARZINOM.....</b>                                                                                              | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Epidemiologie.....                                                                                                          | 1         |
| 1.1.2      | Ätiologie.....                                                                                                              | 2         |
| 1.1.3      | Symptomatik des Lungenkarzinoms .....                                                                                       | 3         |
| 1.1.4      | Einteilung des Lungenkarzinoms.....                                                                                         | 3         |
| <b>1.2</b> | <b>THERAPIE DES LUNGENKARZINOMS .....</b>                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>STRALENTHERAPEUTISCHE BEHANDLUNG DES LUNGENKARZINOMS.....</b>                                                            | <b>10</b> |
| 1.3.1      | Strahlentherapeutische Grundlagen .....                                                                                     | 10        |
| 1.3.2      | Molekulare Wirkung von Strahlung auf zellulärer Ebene.....                                                                  | 12        |
| 1.3.3      | Verlust der reproduktiven Integrität nach Bestrahlung und Dosis-Effekt-Beziehung .....                                      | 13        |
| 1.3.4      | Strahlenwirkung auf Tumoren – die vier „R“-s der Strahlenbiologie.....                                                      | 15        |
| 1.3.5      | Infektionen und Karzinogenese .....                                                                                         | 17        |
| <b>2</b>   | <b>FRAGESTELLUNG .....</b>                                                                                                  | <b>21</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>                                                                                           | <b>22</b> |
| <b>3.1</b> | <b>MATERIAL .....</b>                                                                                                       | <b>22</b> |
| 3.1.1      | Geräte.....                                                                                                                 | 22        |
| 3.1.2      | Zelllinien.....                                                                                                             | 22        |
| 3.1.3      | Zellkulturmaterial.....                                                                                                     | 22        |
| 3.1.4      | Chemikalien, Kits und Sonstiges .....                                                                                       | 23        |
| 3.1.5      | Lösungen .....                                                                                                              | 23        |
| <b>3.2</b> | <b>METHODEN .....</b>                                                                                                       | <b>24</b> |
| 3.2.1      | Zellkultur .....                                                                                                            | 24        |
| 3.2.1.1    | Zelllinie A549 .....                                                                                                        | 24        |
| 3.2.1.2    | Zelllinie H23 .....                                                                                                         | 24        |
| 3.2.1.3    | Zelllinie H226 .....                                                                                                        | 24        |
| 3.2.1.4    | Kultivierung der Zelllinien .....                                                                                           | 25        |
| 3.2.2      | Bestrahlung der Zelllinien.....                                                                                             | 26        |
| 3.2.3      | Koloniebildungstest.....                                                                                                    | 26        |
| 3.2.4      | Zellzählung.....                                                                                                            | 28        |
| 3.2.5      | Bestimmung der Zellproliferation und des Zellüberlebens anhand des MTS-Assays.....                                          | 30        |
| 3.2.6      | Statistische Auswertung.....                                                                                                | 31        |
| <b>4</b>   | <b>ERGEBNISSE .....</b>                                                                                                     | <b>32</b> |
| <b>4.1</b> | <b>ERGEBNISSE DER NSCLC-ZELLINIE A549 .....</b>                                                                             | <b>33</b> |
| 4.1.1      | LPS bewirkt keine signifikante Steigerung des klonogenen Überlebens an unbestrahten A549 Zellen.....                        | 33        |
| 4.1.2      | Unter Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy lässt sich unter LPS-Inkubation eine Zunahme des klonogenen Überlebens beobachten ..... | 34        |

|            |                                                                                                                                           |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.3      | Endotoxin-Effekt auf das klonogene Überleben der A549 Zellen unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy .....                                       | 34        |
| 4.1.4      | In der Zellzählung ist eine Abnahme der Strahlensensibilität der A549 Zellen erkennbar .....                                              | 36        |
| 4.1.5      | Im MTS-Assay kann keine Steigerung des Überlebens der A549 Zellen unter LPS-Inkubation gemessen werden. ....                              | 37        |
| <b>4.2</b> | <b>ERGEBNISSE DER NSCLC-ZELLINIE H23 .....</b>                                                                                            | <b>39</b> |
| 4.2.1      | LPS bewirkt keine Steigerung des klonogenen Überlebens an unbestrahlten H23 Zellen .....                                                  | 39        |
| 4.2.2      | Nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy lässt sich unter LPS-Inkubation eine Zunahme des klonogenen Überlebens der H23 Zellen beobachten ..... | 40        |
| 4.2.3      | Endotoxin-Effekt auf das klonogene Überleben der H23 Zellen unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy .....                                        | 41        |
| 4.2.4      | Mittels Zellzählung ist nach 24 h eine Abnahme der Strahlensensibilität der H23 Zellen erkennbar .....                                    | 43        |
| 4.2.5      | Im MTS-Assay kann keine Steigerung des Überlebens der mit 6 Gy bestrahlten H23 Zellen unter LPS-Inkubation gemessen werden .....          | 44        |
| <b>4.3</b> | <b>ERGEBNISSE DER NSCLC-ZELLINIE H226 .....</b>                                                                                           | <b>45</b> |
| 4.3.1      | LPS bewirkt keine Steigerung des klonogenen Überlebens an unbestrahlten H226 Zellen .....                                                 | 45        |
| 4.3.2      | Endotoxin induziert sowohl nach Bestrahlung mit 2 Gy als auch mit 6 Gy eine Zunahme des klonogenen Überlebens .....                       | 46        |
| 4.3.3      | Endotoxin-Effekt auf das klonogene Überleben der H226 Zellen unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy .....                                       | 47        |
| 4.3.4      | Mittels Zellzählung ist nach 24 h keine Steigerung des Zellüberlebens nach Radiatio messbar .....                                         | 49        |
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION.....</b>                                                                                                                    | <b>50</b> |
| <b>5.1</b> | <b>DIE UNTERSCHIEDLICHE STRAHLENSENSIBILITÄT DER EINZELNEN ZELLINIEN .....</b>                                                            | <b>50</b> |
| <b>5.2</b> | <b>DIE UNTERSCHIEDLICHEN METHODEN ZUR BEURTEILUNG DER STRAHLENSENSITIVITÄT ....</b>                                                       | <b>51</b> |
| <b>5.3</b> | <b>DIE WIRKUNG VON ENDOTOXIN AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN AN UNBESTRAHLTEN ZELLEN .....</b>                                                | <b>53</b> |
| <b>5.4</b> | <b>AUSWIRKUNGEN VON LPS AUF DIE BESTRAHLUNG DER NSCLC-ZELLINIEN .....</b>                                                                 | <b>53</b> |
| 5.4.1      | Bekannte radioprotektive Effekte von Endotoxin und zugrundeliegende Mechanismen .....                                                     | 53        |
| 5.4.2      | Auswirkungen von LPS auf die Bestrahlung der Zelllinie A549 .....                                                                         | 55        |
| 5.4.3      | Auswirkungen von LPS auf die Bestrahlung der Zelllinie H23 .....                                                                          | 56        |
| 5.4.4      | Wirkung von LPS auf die Bestrahlung der Zelllinie H226 .....                                                                              | 57        |
| 5.4.5      | Klinischer Ausblick.....                                                                                                                  | 59        |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                                                                                              | <b>61</b> |
| <b>7</b>   | <b>SUMMARY .....</b>                                                                                                                      | <b>63</b> |
| <b>8</b>   | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>                                                                                                         | <b>65</b> |
| <b>9</b>   | <b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>                                                                                           | <b>67</b> |
| <b>10</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>                                                                                                          | <b>69</b> |
| <b>11</b>  | <b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>                                                                                                      | <b>78</b> |

|           |                                       |           |
|-----------|---------------------------------------|-----------|
| <b>12</b> | <b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b> | <b>79</b> |
| <b>13</b> | <b>DANKSAGUNG .....</b>               | <b>80</b> |
| <b>14</b> | <b>LEBENS LAUF .....</b>              | <b>81</b> |





## 1 Einleitung

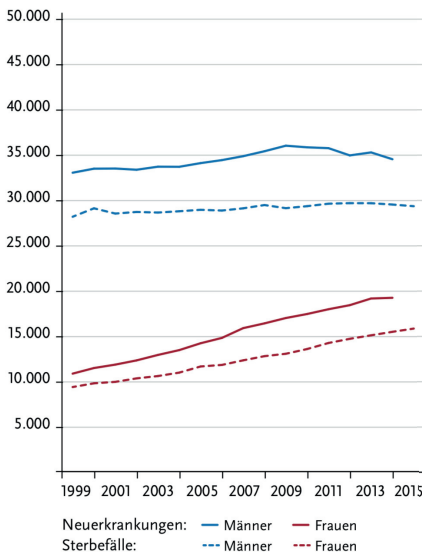
### 1.1 Das Lungenkarzinom

#### 1.1.1 Epidemiologie

Krebserkrankungen stellen in der Bundesrepublik Deutschland nach der chronisch ischämischen Herzerkrankung und dem akuten Myokardinfarkt die zweithäufigste Todesursache dar und sind insbesondere bei Menschen mittleren Alters als bedeutendste Todesursache zu werten (Statistisches Bundesamt (Destatis)2017).

Laut aktuellstem Bericht des statistischen Bundesamtes sowie des Robert-Koch-Institutes von 2015 sind bösartige Neubildungen der Bronchien und der Lunge die vierthäufigste Todesursache überhaupt (Statistisches Bundesamt (Destatis)2017). Neuere statistische Auswertungen des Deutschen Krebsforschungszentrums verdeutlichen, dass insbesondere bei Frauen die Inzidenz des Lungenkarzinoms eine steigende Tendenz aufweist.

#### **Lungenkrebs: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle in Deutschland von 1999-2014/2015**



**Abbildung 1.1:  
Lungenkrebs in  
Deutschland**

Absolute Zahl der  
Neuerkrankungs- und  
Sterbefälle, ICD-10 C33-34,  
Deutschland 1999-  
2014/2015

Quelle: (mit Genehmigung  
des Robert-Koch-Institutes,  
krebdaten.de)

Nach Angaben des aktuellsten Berichtes des Robert-Koch-Institutes konnte bei ca. 19.300 Frauen und 34.500 Männern im Jahre 2014 ein Lungenkarzinom diagnostiziert werden. Insgesamt verstarben 15.524 Frauen und 29.560 Männer, sodass Lungenkrebs in Deutschland mit einem Anteil von 25% die häufigste Krebstodesursache bei Männern und mit einem Anteil von 15% die zweithäufigste bei Frauen darstellt (Robert-Koch-Institut 2017). Insgesamt wurde beobachtet, dass sich Erkrankungs- und Sterberaten bei beiden Geschlechtern gegenläufig entwickeln. Bei Frauen konnte gegen Ende der 1990er Jahre ein Anstieg der Raten um etwa 30% registriert werden, wohingegen die Raten der Männer um ca. 20% sanken. Diese Entwicklung kann vor allem durch Veränderungen der Rauchgewohnheiten von Männern und Frauen begründet werden und wird sich tendenziell weiter fortsetzen (Robert-Koch-Institut 2017). Das Lungenkarzinom gehört zu den prognostisch relativ ungünstigen Tumoren, was sich in einer 5-Jahres-Überlebensrate von 20% bei Frauen und 15% bei Männern ausdrückt (Robert-Koch-Institut 2017).

### **1.1.2 Ätiologie**

Wie auch bei anderen Krebserkrankungen beruht die Entstehung des Lungenkarzinoms auf einem Zusammenspiel multipler Faktoren. Zu nennen sind hierbei insbesondere das Zusammenwirken von Umweltfaktoren, wie etwa der Tabakkonsum, sowie von genetischer Prädisposition. Nicht vernachlässigt werden dürfen Faktoren, die in keinem direkten Zusammenhang mit Zigarettenrauch stehen: Hormonelle Faktoren ebenso wie Entzündungsgeschehen (Herbst et al. 2008).

Tabakrauch gilt weiterhin als Hauptrisikofaktor der Entstehung des Lungenkarzinoms, auch Passivrauchen ist hierbei nicht zu vernachlässigen. Eine weitere wichtige Rolle spielen karzinogene Arbeitsstoffe, wie etwa Asbest, Arsen, Chromat oder Quarz- und Nickelstäube. Chronische Infektionen sowie Entzündungen, beispielsweise durch Papillomaviren oder das Epstein-Barr-Virus, werden ebenso mit der Entstehung des Lungenkarzinoms in Verbindung gebracht (Robert-Koch-Institut 2013).

Schädigungen des Lungengewebes, ausgelöst durch Tabakrauch, resultieren in einer Reihe genetischer und epigenetischer Veränderungen wie Mutationen oder Methylierungsvorgängen. Ebenso können Entzündungs- und Apoptose-Signalkaskaden negativ beeinflusst werden und in eine Dysregulation von Proliferation und Apoptose münden. Durch eine DNA-Schädigung werden Onkogene aktiviert, Tumorsuppressorgene wie p53 ausgeschaltet und Wachstumsfaktoren stimuliert (Herbst et al. 2008).

### **1.1.3 Symptomatik des Lungenkarzinoms**

Die Symptome des Lungenkarzinoms können unter anderem durch Größe und Sitz des Primärtumors ausgelöst werden. Ein Großteil der Symptomatik wird allerdings auch durch die intrathorakale Ausbreitung sowie Metastasierung und paraneoplastische Syndrome ausgelöst (Beckles 2003).

Unspezifischer Husten ist eines der häufigsten Symptome der Erkrankung und wird meist durch poststenotische Pneumonien sowie Lymphknotenvergrößerungen verursacht. Dyspnoe, Hämoptysen und thorakale Missempfindungen können ebenso mit dem Primärtumor in Verbindung gebracht werden (Beckles 2003; Spiro et al. 2007; Hyde et al. 1974).

Bei Befall des N. laryngeus recurrens ist Heiserkeit ein führendes Symptom, welches mit einem erhöhten Aspirationsrisiko einhergeht. Wird das Ganglion stellatum durch einen Pancoast-Tumor angegriffen, resultiert aus dem Befall die sogenannte Horner-Trias mit Ptosis, Miosis und Enophthalmus. Durch eine Obstruktion der Vena cava, insbesondere bei Tumoren in Nähe der Lungenspitze, kann es zu einer oberen Einflusstauung kommen (Beckles 2003; Spiro et al. 2007; Hyde et al. 1974).

Etwa ein Drittel der Patienten präsentiert sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit Symptomen, die bereits auf Metastasierungsvorgänge zurückzuführen sind (Beckles 2003). Häufig entstehen metastatische Absiedelungen in den Lungen, den Knochen, der Leber, den Nebennieren und im Gehirn und führen so zu Symptomen wie Cephalgien, Knochenschmerzen und Gewichtsverlust (Scagliotti et al. 2001).

Insbesondere kleinzellige Lungenkarzinome können paraneoplastische Syndrome verursachen. Insgesamt sind etwa 10% der Erkrankten von einem paraneoplastischen Syndrom betroffen (Beckles 2003). Gelegentlich beruht ein solches Syndrom auf einer vermehrten Ausschüttung an adrenocorticotropem Hormon und resultiert damit in einem Cushing-Syndrom. Weitere Beispiele für paraneoplastische Syndrome sind das Syndrom der inadäquaten ADH-Ausschüttung, die hypertrophe Osteoarthropathie sowie das Myasthenie-ähnliche Lambert-Eaton-Syndrom (Beckles 2003, Spiro et al. 2007).

Insgesamt sind etwa 90% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung symptomatisch. Hiervon präsentiert sich die Mehrheit mit unspezifischen Symptomen oder Symptomen, die der Metastasierung geschuldet sind, wodurch die schlechte Prognose des Lungenkarzinoms verdeutlicht wird (Beckles 2003).

### **1.1.4 Einteilung des Lungenkarzinoms**

Im Jahr 2015 erfolgte durch die WHO eine neuere Einteilung der Lungentumoren. Die große Gruppe der epithelialen Tumoren wird hierbei unter anderem in Adeno- und

Plattenepithelkarzinome sowie neuroendokrine Tumoren unterteilt. Das kleinzellige Lungenkarzinom wird in der neueren Einteilung aufgrund der häufigen Vergesellschaftung mit paraneoplastischen Syndromen den neuroendokrinen Tumoren zugerechnet.

Nichtkleinzellige Karzinome (NSCLC) haben einen Anteil von etwa 85% der Erkrankungen, wohingegen die eine wesentlich schlechtere Prognose aufweisenden kleinzelligen Karzinome (SCLC) einen kleineren Teil aller Lungenkarzinome ausmachen. Unter den NSCLC kann weiterhin zwischen den vorwiegend zentral lokalisierten Plattenepithelkarzinomen und den überwiegend peripher sitzenden Adenokarzinomen, die eine steigende Häufigkeit aufweisen und die häufigste Krebsart bei Nichtrauchern darstellen, unterschieden werden. In der Hälfte aller Fälle können Adenokarzinome diagnostiziert werden. Ein Viertel entfallen auf Plattenepithelkarzinome und etwa ein Fünftel auf das kleinzellige Karzinom (Robert-Koch Institut 2017).

|                                   |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Epitheliale Tumoren</b>        | Adenokarzinom                 | Lepidisches Adenokarzinom<br>Azinäres Adenokarzinom<br>Papilläres Adenokarzinom<br>Mikropapilläres Adenokarzinom<br>Solides Adenokarzinom<br>Invasiv muzinöses Adenokarzinom<br>Kolloides Adenokarzinom<br>Fetales Adenokarzinom<br>Enterales Adenokarzinom<br>Minimal invasives Adenokarzinom<br>Präinvasive Läsionen |
|                                   | Plattenepithelkarzinom        | Verhornendes<br>Plattenepithelkarzinom<br>Nicht verhornendes<br>Plattenepithelkarzinom<br>Basaloides Plattenepithelkarzinom<br>Präinvasive Läsionen                                                                                                                                                                    |
|                                   | Neuroendokrine Tumoren        | Kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC)<br>Großzellig neuroendokrines Karzinom<br>Karzinoide                                                                                                                                                                                                                               |
|                                   | Großzelliges Karzinom         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                   | Adenosquamöses Karzinom       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                   | Pleomorphes Karzinom          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                   | Spindelzelliges Karzinom      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                   | Karzosarkom                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                   | Pulmonales Blastom            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                   | Tumoren vom Speicheldrüsentyp |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Mesenchymale Tumoren</b>       |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Lymphohistiozytäre Tumoren</b> |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Tumoren ektopen Ursprungs</b>  |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Metastatische Tumoren</b>      |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

**Tabelle 1.1: Klassifizierung der verschiedenen Lungentumoren**

Modifiziert nach Travis et al.: The 2015 World Health Organisation Classification of Lung Tumors

## 1.2 Therapie des Lungenkarzinoms

Die derzeit gültige Fassung der interdisziplinären S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms wurde im Februar 2018 veröffentlicht. Bereits seit dem 01.01.2017 ist eine neue Stadieneinteilung des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms nach IASLC/UICC 8 (Union for International Cancer Control/Union Internationale Contre le Cancer) gültig.

| Kategorie       | Status    | Kurzbezeichnung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T (Tumor)       | Tis       | Carcinoma in situ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                 | T1        | Größter Durchmesser bis 3cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                 | • T1a(mi) | Minimal invasives Adenokarzinom (Adenokarzinom mit lepidischem Wachstums muster < 3cm in der größten Ausdehnung und mit einem soliden Anteil < 5mm Durchmesser                                                                                                                                                                                                     |
|                 | • T1a     | Größter Durchmesser ≤ 1cm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                 | • T1b     | Größter Durchmesser > 1cm aber ≤ 2cm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                 | • T1c     | Größter Durchmesser > 2cm aber ≤ 3cm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                 | T2        | Tumor > 3cm und ≤ 5cm <b>oder</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Infiltration des Hauptbronchus unabhängig vom Abstand zur Carina</li> <li>Infiltration der viszeralen Pleura <b>oder</b></li> <li>Tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie, die bis in den Hilus reichen, Teile der Lunge oder die gesamte Lunge umfassen</li> </ul> |
|                 | • T2a     | Größter Durchmesser > 3cm aber ≤ 4cm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                 | • T2b     | Größter Durchmesser > 4cm aber ≤ 5cm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                 | T3        | Größter Durchmesser > 5cm aber ≤ 7cm, <b>oder</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Infiltration von Thoraxwand (inkl. Parietale Pleura und Sulcus superior), N. phrenicus oder parietales Perikard, <b>oder</b></li> <li>Zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen wie der Primärtumor</li> </ul>                                                      |
|                 | T4        | Größter Durchmesser > 7cm oder <ul style="list-style-type: none"> <li>Mit direkter Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. laryngeus recurrens, Trachea, Wirbelkörper oder Carina <b>oder</b></li> <li>Zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen</li> </ul>                                         |
| N (Lymphknoten) | N0        | Keine Lymphknotenmetastasen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                 | N1        | Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und/oder intrapulmonalen Lymphknoten und/oder direkte Invasion dieser Lymphknoten                                                                                                                                                                                           |
|                 | N2        | Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                 | N3        | Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateralen tief zervikalen oder supraklavikulären Lymphknoten                                                                                                                                                                                                                |
| M (Metastase)   | M0        | Keine Fernmetastasen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                 | M1        | Fernmetastasen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                 | • M1a     | Separater Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen <b>oder</b><br>Pleura mit knotigem Befall <b>oder</b><br>Maligner Pleuraerguss <b>oder</b><br>Maligner Perikarderguss                                                                                                                                                                                  |
|                 | • M1b     | Eine solitäre Fernmetastase in einem solitären extrathorakalen Organ                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                 | • M1c     | Mehrere Fernmetastasen in einem oder mehreren Organen                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

**Tabelle 1.2: TNM-Klassifikation des Lungenkarzinoms nach den neuen Leitlinien**  
(Leitlinienprogramm Onkologie 2018)

Das Lungenkarzinom kann anhand der UICC Klassifikation sowie der TNM Klassifikation in vier Stadien eingeteilt werden (Tab. 1.3). Da eine operative Therapie meist nur in den früheren Stadien möglich ist, die meisten Erkrankungen jedoch erst sehr spät

diagnostiziert werden, haben sowohl Chemo- als auch Strahlentherapie einen großen Stellenwert in der Therapie des Lungenkarzinoms. Als operabel gelten Tumoren bis Stadium IIIA, wobei in diesem Stadium weitere Abstufungen vorgenommen werden können und die Therapieentscheidung individuell gefällt werden muss. Unter bestimmten Voraussetzungen kann auch im Stadium IIIB eine operative Therapie oder eine definitive Radio-Chemotherapie unter kurativen Gesichtspunkten erfolgen. Ferner wird in der seit Februar 2018 gültigen S3 Leitlinie eine sogenannte oligometastatische Krankheit (OMD) abgegrenzt. Die TNM-Klassifikation unterscheidet hierfür das Stadium M1a mit pulmonaler Metastasierung und M1b mit einer solitären Metastase in einem extrathorakalen Organ bzw. bis zu 4 Metastasen im Gehirn, welche einer lokal ablativen Therapie zugänglich sind. Dies bedeutet, dass auch Patienten mit M1b-Situation in kurativer Hinsicht behandelt werden können. Die neue Einteilung in das Stadium M1c beschreibt mehrere Fernmetastasen in einem oder mehreren Organen (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

Sowohl in den Stadien I und II, als auch im Stadium IIIA steht die Resektion des Tumors im Vordergrund. Besonders im Falle einer Brustwandinfiltration ist eine R0-Resektion von großer Bedeutung. Obwohl eine Strahlentherapie bei R0-Resektion in den frühen Stadien I und II nicht empfohlen wird (Goeckenjan et al. 2011; PORT Meta-analysis Trialists Group 2005), kann sie bei Brustwandinfiltration trotz kompletter Resektion erwogen werden (Goeckenjan et al. 2011). Im Falle einer R1-Situation sollte, falls möglich, eine Nachresektion erfolgen. Ist dies jedoch nicht realisierbar, steht eine Nachbestrahlung des OP-Bettes mit 60 Gy über 6 Wochen im Vordergrund (Goeckenjan et al. 2011). Das Stadium IIIA kann anhand einer Klassifikation nach Robinson in weitere vier Subgruppen unterteilt werden, wobei hier der Status der Lymphknotenmetastasierung Hauptkriterium der Einteilung ist (Tab. 1.4). Nach Angaben der aktuellen Leitlinie sollte bei Patienten in den Stadien II und IIIA1/A2 eine adjuvante Chemotherapie auf der Basis von Cisplatin über insgesamt vier Zyklen erfolgen, die häufig mit Vinorelbin kombiniert wird. Ein mediastinaler Lymphknotenbefall in den Stadien IIIA1/A2 stellt zusätzlich eine Indikation zur postoperativen Mediastinalbestrahlung dar.

Eine definitive Radiotherapie wird in den Stadien I, II und IIIA nur bei Inoperabilität oder Komorbiditäten empfohlen, die eine Resektion nicht zulassen. Die perkutane Strahlentherapie ist bei solchen Patienten die effektivste Therapie des NSCLC im Stadium I und II, die aufgrund von pulmonalen Funktionseinschränkungen oder anderen Begleiterkrankungen nicht für eine Operation in Frage kommen (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

Hier ist eine definitive lungenparenchymsparende Strahlentherapie zu erwägen, die bei konventioneller Fraktionierung eine Gesamtdosis von > 60 Gy enthalten sollte oder nach dem CHART-Regime hyperfraktioniert und akzeleriert erfolgen kann (Goeckenjan et al. 2011).

In den Stadien IIIA4 und IIIB steht eine definitive Kombination aus Chemo- und Strahlentherapie im Vordergrund der Behandlung. Auch im Stadium IIIA3 mit multiplem N2 Befall kann eine Radiochemotherapie in Erwägung gezogen werden. Allerdings kommt in diesem Stadium auch noch eine multimodale Therapie mit Operation in Frage (Leitlinienprogramm Onkologie 2018). In klinischen Studien wurde gezeigt, dass eine simultane Radio-Chemotherapie im direkten Vergleich einer sequenziellen Therapie überlegen ist (Goeckenjan et al. 2011; O'Rourke und Macbeth 2010; Aupérin et al. 2010), was in höheren Überlebensraten der Patienten resultierte (O'Rourke et al. 2010). Leitliniengerecht werden unter Simultantherapie 2 Zyklen Cisplatin und Etoposid verabreicht. Die Radiatio erfolgt über sechs bis sieben Wochen mit einer Dosis zwischen 60 und 66 Gy bei einmal täglicher Fraktionierung. Da in klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass eine kombinierte Radio-Chemotherapie das progressionsfreie Überleben erhöht (O'Rourke et al. 2010), ist eine alleinige definitive Strahlentherapie nur bei Vorliegen von Kontraindikationen für eine Chemotherapie indiziert.

Die nach Leitlinien unter palliativen Gesichtspunkten konzipierte Erstlinien-Systemtherapie zur Behandlung von Patienten in den Stadien IIIB oder IV beinhaltet eine cisplatinbasierte Kombinationschemotherapie zur Verbesserung der Überlebenszeit, der Krankheitskontrolle und der Lebensqualität (Goeckenjan et al. 2011). Bestehen relevante Komorbiditäten, so kann anstelle von Cisplatin das weniger toxische Carboplatin eingesetzt werden. Bei reduziertem Allgemeinzustand sowie Kontraindikationen gegen eine platinhaltige Chemotherapie kann die Therapie mit einem Drittgenerationszytostatikum wie Vinorelbin oder Gemcitabin erfolgen.

Im Stadium IV sollen anhand des zur Verfügung stehenden Tumorgewebes von allen nicht kurativ behandelbaren NSCLCs molekularpathologische Untersuchungen hinsichtlich aller therapierelevanter Veränderungen wie etwa EGFR-Mutationen, ALK- und ROS-1-Fusionen sowie BRAF-V600-Mutationen erfolgen und der PD-L1-Rezeptorstatus erhoben werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

Ergänzend zur Chemotherapie können in weit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium verschiedene sogenannte „biologicals“ eingesetzt werden, die gezielt in die Tumorbilogie eingreifen. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Nicht-Plattenepithel-Karzinom im Stadium IIIB/IV die zusätzliche Behandlung mit dem



antiangiogenetisch wirkendem Antikörper Bevacizumab oder auch mit dem neueren Nintedanib zu einer Verbesserung der Remissionsrate und des medianen Überlebens führt (Herbst und Sandler 2008; Sandler et al. 2006; Goeckenjan et al. 2011; Reck et al. 2014). Ebenso können insbesondere Patienten mit Plattenepithelkarzinom und mit diagnostizierter EGFR-Mutation im fortgeschrittenen Krankheitsstadium von einer Therapie mit EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Gefitinib, Erlotinib, Afatinib und Osimertinib profitieren (Song und Zhang 2015; Brückl et al. 2010; Mok et al. 2009; Herbst und Sandler 2008; Park et al. 2016; Soria et al. 2018). Neue Studien zeigten eine Überlegenheit bezüglich Gesamtüberlebenszeit und progressionsfreiem Überleben bei Kombination des Zweitgenerations-EGFR-Inhibitors Necitumumab mit einer platinbasierten Chemotherapie im Vergleich zu einer alleinigen Chemotherapie (Thatcher et al. 2015). Die Kombination von Necitumumab und Cisplatin mit einem Drittgenerationszytostatikum wie Gemcitabin ist im fortgeschrittenen Stadium eines nichtkleinzelligen Plattenepithelkarzinoms als Erstlinientherapie definiert.

In den letzten Jahren haben darüber hinaus immunologische Therapieansätze zur Behandlung des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms zunehmend an Bedeutung gewonnen. In den Fokus ist hierbei insbesondere der PD-1-Rezeptor und sein Ligand gerückt: Dieser Rezeptor besitzt regulative Funktionen über die Effektor-T-Zellantwort und induziert im Normalfall immunsuppressive Mechanismen, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern (Vigano et al. 2012). Tumorzellen können PD-1 Liganden wie PD-L1 exprimieren und hochregulieren und sich so vor einer antitumorösen Immunantwort schützen (Pardoll et al. 2012). Seit Mitte 2016 hat der humanisierte monoklonale Antikörper Pembrolizumab die Zulassung zur Behandlung des fortgeschrittenen NSCLC im Stadium IV bei einer hohen PD-L1 Expression  $\geq 50\%$ . In ihrer KEYNOTE-024 Studie konnten Reck et al. zeigen, dass Pembrolizumab gegenüber einer platinbasierten kombinierten Chemotherapie im Stadium IV bei entsprechend hoher PD-L1 Expression einen signifikanten Vorteil bezüglich der Endpunkte progressionsfreies Überleben sowie der therapieassoziierten Nebenwirkungen hat (Reck et al. 2016). In den neuen Leitlinien von 2018 ist daher Pembrolizumab bei therapie-naiven Patienten im Stadium IV mit einer PD-L1 Expression  $\geq 50\%$ , welche keine anderweitigen therapierbaren Mutationen aufweisen als Erstlinientherapie festgelegt worden (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

Der voll humanisierte, bereits seit Juli 2015 zugelassene anti-PD1 Antikörper Nivolumab konnte gegenüber der regulären Zweitlinientherapie des Plattenepithelkarzinoms mit Docetaxel ebenfalls einen Vorteil bezüglich des medianen Überlebens zeigen (Brahmer et al. 2015).

| Stadium | Primärtumor                           | Lymphknoten                | Fernmetastasen             |
|---------|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0       | Tis                                   | N0                         | M0                         |
| IA 1    | T 1a (mi)<br>T 1a                     | N0<br>N0                   | M0<br>M0                   |
| IA 2    | T 1b                                  | N0                         | M0                         |
| IA 3    | T 1c                                  | N0                         | M0                         |
| IB      | T 2a                                  | N0                         | M0                         |
| IIA     | T 2b                                  | N0                         | M0                         |
| IIB     | T 1a-c<br>T 2a,b<br>T 3               | N1<br>N1<br>N0             | M0<br>M0<br>M0             |
| IIIA    | T 1a-c<br>T 2a,b<br>T 3<br>T 4<br>T 4 | N2<br>N3<br>N1<br>N0<br>N1 | M0<br>M0<br>M0<br>M0<br>M0 |
| IIIB    | T 1a-c<br>T 2a,b<br>T 3<br>T 4        | N3<br>N3<br>N2<br>N2       | M0<br>M0<br>M0<br>M0       |
| IIIC    | T 3<br>T 4                            | N3<br>N3                   | M0<br>M0                   |
| IVA     | Jedes T<br>Jedes T                    | Jedes N<br>Jedes N         | M1a<br>M1b                 |
| IVB     | Jedes T                               | Jedes N                    | M1c                        |

**Tabelle 1.3:****Einteilung des Lungenkarzinoms nach UICC 8** (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

| Stadium | Beschreibung                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| III A1  | Inzidentelle Lymphknotenmetastasen nach postoperativer Aufarbeitung im Präparat                                                                                                                                                                                              |
| III A2  | Intraoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer Lymphknotenstation                                                                                                                                                                                               |
| III A3  | Präoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer oder mehreren Lymphknotenstationen (PET, Mediastinoskopie, Biopsie)                                                                                                                                                |
| III A4  | Ausgedehnte („bulky“) oder fixierte N2-Metastasen oder Metastasen in mehreren Lymphknotenstationen (mediastinale Lymphknoten > 2-3cm) mit extrakapsulärer Infiltration, Befall mehrerer N2-Lymphknotenpositionen; Gruppen multipler befallener kleinerer (1-2cm) Lymphknoten |

**Tabelle 1.4:****Einteilung des Stadium IIIA des Lungenkarzinoms** nach Robinson et al. 2003

## 1.3 Strahlentherapeutische Behandlung des Lungenkarzinoms

### 1.3.1 Strahlentherapeutische Grundlagen

Da die meisten Lungenkarzinome erst in fortgeschrittenem Stadium entdeckt werden, stellt die strahlentherapeutische Behandlung eine wesentliche Therapiesäule dar. Generell wird als Strahlung jede Ausbreitung von Energie in einem freien Raum bezeichnet (Born et al. 2006).

Zunächst muss zwischen Teilchenstrahlung, die aus teilweise geladenen Korpuskeln wie Elektronen, Positronen, Protonen und  $\alpha$ -Teilchen sowie ungeladenen Neutronen besteht, und Wellen- oder elektromagnetischer Strahlung unterschieden werden.

Sowohl die in der klinischen Behandlung des Lungenkarzinoms wichtige Röntgenstrahlung als auch  $\gamma$ -Strahlung werden als elektromagnetische Wellenstrahlung bezeichnet. Geladene Korpuskeln können direkt ionisierend wirken, indem sie direkt Elektronen aus einer Atomhülle schlagen und so für den Verbleib von geladenen Atomen sorgen. Im Gegensatz dazu wirken sowohl Röntgen- als auch  $\gamma$ -Strahlen indirekt ionisierend, indem sie bei Wechselwirkung mit Materie verschiedene Primärprozesse wie Photoeffekt, Compton-Effekt, Paarbildung, Rayleigh-Streuung und bei genügend hoher Strahlungsenergie Kernreaktionen hervorrufen können (Herrmann et al. 2006). Als Folge dieser entstehenden Primärprozesse kann die Strahlung abgeschwächt werden oder es kann Streustrahlung entstehen. Als Sekundärprozesse werden hingegen chemische oder biochemische Prozesse bezeichnet, die durch Anregung oder Ionisation hervorgerufen werden und zu Veränderungen an Biomolekülen führen. Hier muss zwischen direkter Strahlenwirkung, bei der Energieabsorption und Wirkung im gleichen Molekül stattfinden und indirekter Strahlenwirkung unterschieden werden. Indirekte Strahlenwirkung bedeutet, dass Energieabsorption und Wirkung in unterschiedlichen Molekülen eintreten, indem diffusible Radikale entstehen, die die kritischen Zielmoleküle schädigen (Herrmann et al. 2006; Baskar et al. 2012). Im Rahmen der indirekten Strahlenwirkung spielt die Radiolyse des Wassers eine bedeutsame Rolle, da der menschliche Organismus zum Großteil aus Wassermolekülen besteht. Durch Korpuskeln oder Photonen werden Wassermoleküle angeregt und zerfallen in H- und OH-Radikale, die miteinander, mit Biomolekülen, aber auch Sauerstoff reagieren können und so zur Bildung giftiger Peroxidradikale führen. Durch diesen Mechanismus wird die Strahlenwirkung in Anwesenheit von Sauerstoff um ein dreifaches verstärkt (Zips et al. 2004).

Eine sehr wichtige Messgröße in der strahlentherapeutischen Behandlung stellt die Energiedosis  $D$  dar, die sich aus dem Quotienten der in einem Volumen absorbierten Energie  $E$  und der Masse  $M$  dieses Volumens zusammen setzt und in Gray ( $Gy = 1J/kg$ ) angegeben wird (Born et al. 2006). Als linearen Energietransfer (LET) beschreibt man den mittleren Energieverlust  $\Delta E$  entlang eines Weges  $\Delta S$  des Primärstrahls, welcher in  $KeV/\mu m$  angegeben wird. Anhand des linearen Energietransfers kann nun zwischen lockerer und dicht ionisierender Strahlung unterschieden werden. Die in der Behandlung des Lungenkarzinoms heutzutage häufig angewandte Photonenbestrahlung wird bei einem niedrigen LET der locker ionisierenden Strahlung zugeordnet. Dies bedeutet, dass die Strahlung auf ihrer Flugstrecke zu vielen Einzelanregungen oder -ionisationen führt, was mit einer geringen Ionisationsdichte verbunden ist. So entsteht durch Photonenstrahlung eine große Anzahl von Strukturveränderungen jedoch geringeren Ausmaßes und die indirekte Strahlenwirkung überwiegt (Herrmann et al. 2006).

### 1.3.2 Molekulare Wirkung von Strahlung auf zellulärer Ebene

Die DNA stellt das intrazelluläre Zielmolekül der Bestrahlung dar (Baskar et al. 2012), was sich unter anderem dadurch äußert, dass verschiedene mit einer Einschränkung der DNA-Reparatur einhergehende genetische Erkrankungen, mit einer erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit verbunden sind (Nahas und Gatti 2009; Martin et al. 2014; Herrmann et al. 2006). So führt schon eine Dosis von 1 Gy zu etwa  $10^5$  Ionisationen pro Zelle, die in etwa 1000-2000 Einzelstrang- und 40 Doppelstrangbrüchen pro Zellkern resultieren (Liau et al. 2013), die wiederum als auslösender Faktor für Chromosomenabberationen gesehen werden können. Strahlung wirkt allerdings nicht nur auf den Zellkern, sondern kann ihre Wirkung auch an der Zellmembran, membranassoziierten Rezeptoren oder Tyrosinkinasen entfalten und über Signalkaskaden beispielsweise zu einer Änderung der Proliferationsgeschwindigkeit führen (Herrmann et al. 2006). Photonenstrahlung schädigt DNA auf indirekte Weise: Durch Bildung hochreaktiver Radikale entstehende chemische Veränderungen können zu Schäden in Form von Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen (DSB), Basenschäden, DNA-Protein-Verbindungen und irreversiblen Bulky-Lesions (Mehrfachschäden) führen (Dikomey et al. 2003; Orth et al. 2014). Hierbei stellen DSBs die für die Zelle kritischsten aller Ereignisse dar (Iliakis 1991; Foray et al. 1998). Innerhalb verschiedener Tumorzelllinien vorherrschende Variationen der DSB-Induktion gelten als Hauptfaktor für eine unterschiedliche Strahlensensibilität dieser Zelllinien (Roos et al. 2000; Ruiz de Almodovar, J M et al. 1994). Als Antwort auf strahleninduzierte DNA-Schäden verfügt die Zelle über verschiedene Reparaturmechanismen, die enzymvermittelt innerhalb weniger Stunden ablaufen. DSBs werden dabei mittels des sogenannten „non homologous end joining“ (NHEJ) behoben (Dasika et al. 1999), was den in Säugetierzellen insgesamt vorherrschenden Reparaturmechanismus darstellt (Wang et al. 2001). Hierbei werden die DNA Enden nach Entfernung der geschädigten Nukleotide ohne homologe Matrize enzymatisch zusammengefügt, was allerdings in einer nicht immer korrekt hergestellten DNA Sequenz resultiert (Essers et al. 2000; Herrmann et al. 2006). Insgesamt stellen residuelle oder fehlerhaft reparierte DSBs den wichtigsten Mechanismus der strahlenbiologischen Wirkung dar (Herrmann et al. 2006).

Ferner verfügt die Zelle über verschiedene Kontrollmechanismen, die den Zellzyklus an sogenannten Kontrollpunkten anhalten können. Dieser sogenannte G1 Check-Point, der am Ende der G1 Phase des Zellzyklus verhindert, dass Zellen mit beschädigter DNA in die S-Phase übergehen und ein G2 Check-Point, der nach der Reduplikation der DNA Zeit für Reparaturprozesse bietet, führen zu einer dosisabhängigen Verzögerung der Zellteilung nach Bestrahlung (Herrmann et al. 2006). Die durch Bestrahlung ausgelösten

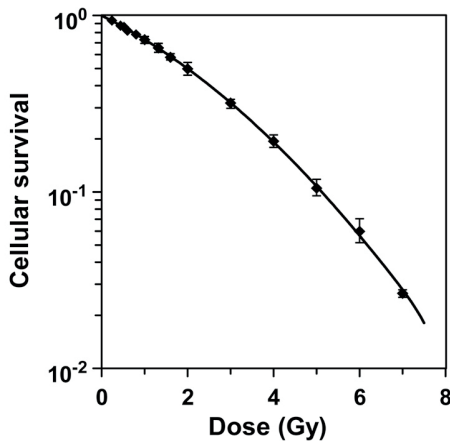
verschiedenen Schädigungen des Erbgutes führen innerhalb der Zelle zur Auslösung von Apoptose. Von den insgesamt fünf Arten des Zelltodes beschreibt Apoptose neben Nekrose, Autophagie, Mitosetod und zellulärer Seneszenz (Orth et al. 2014) den aktiven Prozess des programmierten Zelltodes, der unter anderem durch Bläschenbildung der Zellmembran, Karyopyknose und Karyorrhexis sowie Kondensation und Fragmentation gekennzeichnet ist (Kerr et al. 1972; Bidere und Senik 2001). Unterschieden werden können ein extrinsischer Weg, der über Anlagerung von sogenannten Todesliganden an ihre Zelloberflächenrezeptoren und Aktivierung von Caspasen zur Auslösung des programmierten Zelltodes führt (Bidere und Senik 2001; Debatin und Kramer 2004), und ein intrinsischer Weg, der über Freisetzung mitochondrialer Proteine den strahlenbiologisch bedeutsameren Mechanismus darstellt (Rudner et al. 2001; Herrmann et al. 2006; Johnstone et al. 2002). Gegenüber dieser sogenannten klassischen Apoptose muss ein zu einem späteren Zeitpunkt stattfindender programmierter Zelltod abgegrenzt werden, der auch noch später als 1-2 Tage nach Bestrahlung auftreten kann. Neben der klassischen und späten Apoptose stellt der Mitosetod, bei dem die Zellen zunächst morphologisch intakt und metabolisch aktiv bleiben bevor sie ihre Proliferation nach einigen Mitosen einstellen, einen der strahlenbiologisch bedeutsamsten Mechanismen des Zelltodes dar. Ebenso kann durch Bestrahlung eine verfrühte Differenzierung von klonogenen Zellen resultieren, wodurch terminale Funktionszellen entstehen, die keine Kolonien mehr bilden können (Herrmann et al. 2006).

### **1.3.3 Verlust der reproduktiven Integrität nach Bestrahlung und Dosis-Effekt-Beziehung**

Als klonogen werden Zellen bezeichnet, die mehrere Zellteilungen durchlaufen und dabei Kolonien von mindestens 50 Tochterzellen bilden. In nicht pathologischem Gewebe besitzen lediglich Stammzellen solche Eigenschaften, wohingegen unter pathologischen Umständen Tumorzellen diese Teilungsfähigkeit besitzen (Herrmann et al. 2006). Der durch Bestrahlung ausgelöste Verlust der Koloniebildungsfähigkeit wird auch als klonogener Zelltod bezeichnet (Mirzayans et al. 2013), welcher hauptsächlich durch entstehende chromosomale Abberationen verursacht wird (Ballarini et al. 2014). Anhand eines sogenannten Koloniebildungstests (siehe Abschnitt Material und Methoden) können Rückschlüsse auf die Überlebensrate klonogener Zellen gewonnen werden, welche in Form einer Zellüberlebenskurve erstmals durch Puck und Marcus an menschlichen HeLa-Zellen veröffentlicht wurde (Puck und Marcus 1956).

Die heutige Darstellung von Zellüberlebenskurven und einer Dosis-Effekt-Beziehung erfolgt mathematisch mit Hilfe des Linear-Quadratischen-Modells nach Kellerer und

Rossi. In Grafiken, die anhand dieses Modells erstellt wurden, wird die Dosis in linearer und die überlebende Fraktion in logarithmischer Form dargestellt.



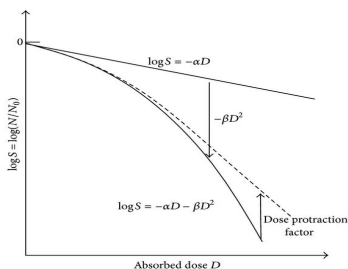
**Abbildung 1.2:** Darstellung des Zellüberlebens mit Hilfe des linear quadratischen Modells

(mit Genehmigung von Brenner 2008)

Vorteil dieses Modells ist, dass insbesondere das zelluläre Überleben bei Bestrahlung mit klinisch relevanten Dosen von 1-5 Gy gut beschrieben werden kann (Brenner 2008; Herrmann et al. 2006). Da sich grafisch im Bereich kleiner Dosen eine Art Schulter abbildet, werden diese Kurven auch als Schulterkurven bezeichnet. Im Bereich höherer Dosen ist der Kurvenverlauf bei halblogarithmischer Darstellung jedoch annähernd linear. Insgesamt begründet sich dieses mathematische Modell durch die Entdeckung, dass der Logarithmus der mit einer bestimmten Energiedosis  $D$  bestrahlten überlebenden Zellfraktion  $S$  anhand einer linear-quadratischen dosisabhängigen Formel beschrieben werden kann (Scheidegger et al. 2013):

$$(\log S(D) = -(\alpha D + \beta D^2))$$

Sowohl der  $\alpha$ - als auch der  $\beta$ -Wert stellen gewebsspezifische Konstanten dar, die ein Maß für die Strahlensensibilität darstellen.



**Abbildung 1.3:** Darstellung des linear-quadratischen Modells. Veranschaulichung der einzelnen Komponenten.

(mit Genehmigung von Scheidegger et al. 2013)

Hierbei stellt ( $-\alpha D$ ) die lineare und ( $-\beta D^2$ ) die quadratische Komponente der Kurve dar (Herrmann et al. 2006). Nicht reparable letale Strahlenschäden sind in nichtlinearer Weise von der Dosisleistung abhängig und werden somit grafisch durch ( $-\beta D^2$ ) abgebildet. Durch niedrigere Energiedosen verursachte reparable subletale Schäden werden hingegen durch ( $-\alpha D$ ) dargestellt und bestimmen die Anfangsneigung der Kurve, während die Krümmung der Kurve durch die quadratische Komponente  $-\beta D^2$  bestimmt wird (Scheidegger et al. 2013; Herrmann et al. 2006).

Wird das Zellüberleben auf der Y-Achse nicht in logarithmischer Form, sondern prozentual aufgetragen, so stellt sich der Kurvenverlauf sigmoid dar. Ferner muss erwähnt werden, dass der Kurvenverlauf zellzyklusabhängig ist, da die verschiedenen Stadien des Zellzyklus unterschiedliche Strahlensensibilitäten aufweisen (Chadwick und Leenhouts 1973).

### **1.3.4 Strahlenwirkung auf Tumoren – die vier „R“-s der Strahlenbiologie**

Aufgrund der großen Heterogenität verschiedener Tumoren, die nicht nur durch die Tumorart, sondern auch durch unterschiedliche Mutationen innerhalb desselben histologischen Subtyps bedingt ist, kann die Ansprache auf Bestrahlung erhebliche Unterschiede aufweisen (Moding et al. 2013). In Hinblick auf das Tumorstadium kann gesagt werden, dass das Tumorstadium zunächst exponentiell ansteigt. Mit zunehmender Tumorstadium fällt das Wachstum allerdings immer langsamer aus, was durch stetig größer werdende Oxygenierungsmängel des Tumors verursacht wird. Insgesamt können drei wesentliche Ziele der Strahlentherapie in Bezug auf Tumore definiert werden: Tumorstadium und lokale Tumorkontrolle, wobei hier unter kurativen Therapieabsichten die letzte klonogene Zelle abgetötet sein muss, sowie Tumorstadiumsverzögerung unter nicht kurativen Therapieabsichten (Herrmann et al. 2006). Wesentlicher, diesen Zielen dienlicher Mechanismus stellt die Schädigung des Erbgutes durch Doppelstrangbrüche und dessen fehlerhafte Reparatur sowie Auslösung von Apoptoseprogrammen dar (El-Awady et al. 2003; Dikomey et al. 2003). Insgesamt ist die Wirkung von Strahlung auf Tumoren abhängig von der DNA Reparatur und dem Verbleib residueller DSBs, der Redistribution, der Repopulation und der Reoxygenierung hypoxischer Tumoreareale (Pajonk et al. 2010). Diese wichtigen Teileffekte der Strahlentherapie werden auch als die „4 Rs“ der Strahlenbiologie nach Withers bezeichnet. Redistribution bedeutet hierbei eine Aufhebung des strahleninduzierten synchronisierten Zellzyklusarrestes, Repopulation beschreibt eine erhöhte Teilungsrate klonogener Tumorzellen nach radiogener Zerstörung (Withers 1975; Pajonk et al. 2010).

In Strahlentherapieplänen zur Behandlung vieler Karzinome erfolgt das Behandlungsregime fraktioniert, was bedeutet, dass tägliche Fraktionen von etwa 1,5-3 Gy über mehrere Wochen appliziert werden (Baskar et al. 2012). Bei diesem Behandlungskonzept wird der Nutzen daraus gezogen, dass sich Zellen des nicht-tumörösen Gewebes wesentlich langsamer teilen als Krebszellen und so mehr Zeit besitzen, strahleninduzierte Schäden vor bevorstehender Replikation zu reparieren. Dies bedeutet, dass das Normalgewebe bei der fraktionierten Strahlentherapie vergleichsweise geschont wird (Baskar et al. 2012). Redistribution gründet sich auf der unterschiedlichen Strahlensensibilität von Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen, wobei mitotische Zellen die größte Strahlensensibilität aufweisen (Pawlik und Keyomarsi 2004). Dosisfraktionierung führt hierbei zu einer Umverteilung von sich in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen radioresistenten Krebszellen in eine strahlensensiblere Phase und so zu einem therapeutischen Benefit (Pajonk et al. 2010). Repopulation beschreibt einerseits einen möglichen Grund für ein Therapieversagens nach strahlentherapeutischer Behandlung (Withers et al. 1988). Gewebe mit hohem Zellumsatz, wie auch Tumorgewebe, können auf fraktionierte Bestrahlungen mit Regeneration reagieren, indem die Stammzellteilung beschleunigt werden kann (Herrmann et al. 2006; Pajonk et al. 2010). Andererseits wirkt sich dieses Verhalten auf Normalgewebe durch angeregte regenerative Prozesse protektiv aus, wohingegen Tumorzellen aufgrund ihrer geringeren Erholungsfähigkeit vom subletalen Strahlenschaden stärker geschädigt werden können (Herrmann et al. 2006).

Wie bereits erwähnt, sind hypoxische Tumorzellen um den Faktor 2-3 strahlenresistenter als mit Sauerstoff versorgte Zellen (Thomlinson und Gray 1955; Pajonk et al. 2010). Nach Bestrahlung können innerhalb des Tumors verschlossene Gefäße temporär wiedereröffnet werden, was zu einer Verbesserung der Strahlensensibilität führt und als Reoxygenierung bezeichnet wird (Herrmann et al. 2006). Gut und ausreichend oxygenierte Zellen werden durch den Bestrahlungsvorgang abgetötet, was im Folgenden eine Reoxygenierung von hypoxischen Zellen bedingt, die dann wiederum strahlensensibler sind und durch die nächste Fraktion abgetötet werden können.

Eine große Herausforderung in der Strahlentherapie stellt die bestmögliche Effektivität der Bestrahlung des Tumors bei gleichzeitiger Schonung des umgebenden Gewebes dar (Saadeddin 2012). In der Bestrahlungsplanung spielt die Computertomografie eine übergeordnete Rolle und stellt die Grundlage der Planung dar. Mittels computertomografischer Planung kann heutzutage die dreidimensionale Strahlentherapie als Standard angewendet werden. Lageveränderungen des Tumors, z.B. durch Atmung während der Behandlung oder Größenveränderung des Tumors, werden hierbei durch Sicherheitsabstände kompensiert (Herrmann et al. 2006). Um das



umliegende Gewebe, insbesondere das Rückenmark, zu schonen, wird der Tumor aus verschiedenen Richtungen bestrahlt (Tsutsumi et al. 2014). Auch beim Lungenkarzinom werden die Dosisvolumenhistogramme der kritischen umgebenden Risikoorgane mittels 3D-Planung abgeschätzt. Zur kurativen Strahlentherapie eines Lungenkarzinoms im UICC Stadium III eignet sich die konventionelle Fraktionierung mit 1,8-2 Gy/Tag (5x/Woche) bis zu einer Gesamtdosis von >60-70 Gy (Leitlinienprogramm Onkologie 2018, Goeckenjan et al. 2011).

### **1.3.5 Infektionen und Karzinogenese**

Bereits im Jahre 1863 entdeckte Virchow das Tumorgewebe infiltrierende Leukozyten und demonstrierte so erste Zusammenhänge zwischen Entzündung und Krebs (Balkwill und Mantovani 2001). Zudem sind seit vielen Jahren pathogene Keime bekannt, die, wie *Helicobacter pylori*, durch Aufrechterhaltung chronischer Entzündungsprozesse zur Krebsentstehung beitragen (Vogelmann und Amieva 2007). Inflammation kann die Karzinogenese auf unterschiedlichen Wegen vorantreiben, wobei durch verschiedene Signalkaskaden ausgelöste anti-apoptotische Effekte sowie die Proliferation von Fibroblasten im Sinne einer Gewebe-Reparatur von großer Bedeutung sind (Rakoff-Nahoum und Medzhitov 2008). Eine weitere wichtige Rolle spielt die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) und reaktiver Stickstoffradikale (iNOS), die durch Schädigung der DNA zu Zellmutationen führen und somit zur Krebsentstehung beitragen können (Tsan 2006).

Eine Schlüsselrolle in der Wirtsantwort auf pathogene Keime spielen sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLRs), die als Mitglied der Pattern Recognition Receptors (PRRs) der IL-1 Rezeptor Superfamilie angehören (Tsan 2006). Wesentliche Aufgabe dieser Rezeptoren ist vor allem die Erkennung pathogener Bestandteile von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, Viren und Pilzen, die auch als „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) bezeichnet werden (Kopp und Medzhitov 1999). Allerdings dienen TLRs nicht nur der Erkennung mikrobieller Keime, sondern auch der Detektion endogener Moleküle, die aus verletzten oder absterbenden Zellen freigesetzt werden, sogenannter „Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs)“ (Sato et al. 2009; Kluwe et al. 2009; Lotze et al. 2007). TLRs werden sowohl von verschiedenen Immunzellen als auch von Epithelzellen exprimiert, die mit der Umwelt in Kontakt stehen und befinden sich teilweise auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma (Sato et al. 2009). In Hinblick auf diese Arbeit ist von großer Bedeutung, dass eine Hochregulation von TLR4 an Adenokarzinomzellen der Lunge gefunden werden konnte (Zhang et al. 2009). Ferner

konnten Zhang et al. in ihrer Arbeit zeigen, dass die Expression von TLR4 mit der Malignität des Tumors korreliert.

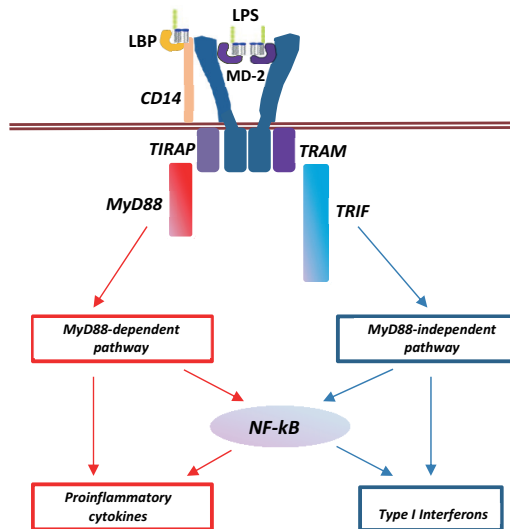
Durch ihre vielfältigen Aufgaben spielen Toll-like Rezeptoren eine wesentliche Rolle in der Antwort sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems (Gribar et al. 2008; Lotze et al. 2007). Von den insgesamt 11 bei Menschen identifizierten Toll-like-Rezeptoren dient vor allem TLR4 der Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS) aus der Zellwand gram-negativer Bakterien (Sato et al. 2009; Kluwe et al. 2009). Dies ist von besonderer Bedeutung, da LPS, das sogenannte Endotoxin, den Hauptpathogenitätsfaktor gram-negativer Keime darstellt.

Lipopolysaccharide sind in der äußeren Membran der Zellwand gramnegativer Bakterien verankert. Sie bestehen aus einem O-Polysaccharid, einer Kernregion sowie einem Lipid A, welches für die besonders toxischen Eigenschaften verantwortlich ist (Schletter et al. 1995). Erst durch die Immunantwort des Wirtes kommt es zu einem Zerfall der Bakterien und letztlich zur Freisetzung von LPS.

LPS bindet dann an spezifische Rezeptorstrukturen der Zielzellen wie TLR4 (Schletter et al. 1995). Der LPS-TLR4 Signalweg beinhaltet eine Reihe weiterer wichtiger Moleküle: So spielen zum Beispiel CD14 und der TLR4/MD2-Rezeptor Komplex eine wichtige Rolle in der Erkennung und Bindung. Ein sogenanntes LPS-Bindeprotein bindet direkt an LPS, wodurch die Bindung zwischen CD14 und LPS vereinfacht wird (Tobias et al. 1986; Wright et al. 1989). CD14 wiederum erleichtert die Bindung von LPS an den TLR4/MD2-Rezeptor Komplex (Wright et al. 1990). Nach LPS-Erkennung oligomerisiert TLR4 und aktiviert über Interaktion mit dem Toll-Interleukin 1 Rezeptor (TIR) weitere Adaptermoleküle, die TIRAP, MyD88, TRAM und TRIF genannt werden (Lu et al. 2008). Weiterhin kann zwischen einem MyD88-abhängigem Signalweg, der durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zur Bildung proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL1, IL6 und G-CSF führt (Sato et al. 2009; Lu et al. 2008) und einem MyD88-unabhängigem Signalweg, an dessen Ende die Bildung des zur Abtötung von Viren und Bakterien wichtigem IFN $\gamma$  steht (Bowie und Haga 2005; Perry et al. 2005), unterschieden werden. Letztendlich wird durch die sogenannten PAMPS und DAMPS eine Kaskade ausgelöst, die unter anderem durch Rekrutierung dendritischer Zellen antigenspezifische Immunität bewirkt (Lotze et al. 2007; Banchereau und Steinman 1998).

Jedoch kann die über Toll-like-Rezeptoren ausgelöste Signalkaskade durch direkte, aber auch durch indirekte Bildung immunsuppressiv wirkender Mediatoren wie IL10 und TGF $\beta$  wesentlich zur Abschwächung des wirtseigenen Immunsystems und somit zur Tumorprogression beitragen (Sato et al. 2009). So werden in vielen Tumoren durch die TLR-Signalkaskade zwar vermehrt dendritische Zellen, die der Antigen-Präsentation

dienen, rekrutiert, diese können sich jedoch unter Einfluss von im Mikromilieu des Tumors befindlichem VEGF, IL6, IL1, TGF $\beta$ , COX-2 und PGE<sub>2</sub> nicht endgültig differenzieren (Zou 2005; Sato et al. 2009). Ferner resultiert die über die TLR-Aktivierung ausgelöste Signalkaskade in der Bildung eines tumoreigenen, pro-inflammatorischen und prä-proliferativen Mikromilieus. Hierbei spielt z.B. die tumoreigene Produktion von COX-2 Produkten wie PGE<sub>2</sub>, IL8, TGF $\beta$  und VEGF eine entscheidende Rolle, was durch Induktion von Angiogenese und erhöhtem Metastasierungspotenzial zur Progression des Tumors beitragen kann (He et al. 2007). Ebenso kann das Tumorwachstum durch Induktion anti-apoptotischer Faktoren bedingt sein, die nach TLR-Aktivierung gebildet werden (Rakoff-Nahoum und Medzhitov 2008). All diese Mechanismen spiegeln jedoch nur einen sehr kleinen Teil der komplexen Interaktionen zwischen Immunzellen, Chemokinen, Interleukinen und Krebszellen wider.



**Abbildung 1.4:**  
Modifiziert nach Lu et al. 2008

Darstellung der LPS-TLR4-Signalkaskade. Das an LBP gebundene LPS dockt über CD14 an einen TLR4/MD2 Komplex an. Über verschiedene Adaptermoleküle wird ein MyD88-abhängiger oder –unabhängiger Signalweg aktiviert. Über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B werden schließlich proinflammatorische Zytokine oder Interferon  $\gamma$  produziert.

Wie schon oben beschrieben spielen neben Nikotinabusus als Hauptrisikofaktor der Krebsentstehung bestehende chronische Entzündungen (Candido und Hagemann

2013) eine bedeutende Rolle. Bereits im 19. Jahrhundert wurde aber erkannt, dass Entzündungsprozesse in der Krebsentstehung von enormer Bedeutung sind und, dass Entzündungszellen einen Großteil des Tumorgewebes infiltrieren (Balkwill und Mantovani 2001). Ebenfalls in Bezug auf das Lungenkarzinom wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass erkrankte Patienten häufig an Atemwegsinfekten leiden und, dass diese die mediane Überlebenszeit deutlich vermindern können (Perlin et al. 1990). Eine bedeutende Rolle spielen hierbei gram-negative Bakterien wie *E.coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, die am häufigsten aus der bronchoalveolären Lavage erkrankter Patienten isoliert werden konnten (Putinati et al. 1994; Zhang und Cao 2010).

Die überdurchschnittlich häufige Vergesellschaftung von bronchopulmonalen Infektionen und Lungenkarzinomen gab in dieser Dissertation Anlass, in vitro zu untersuchen, inwieweit sich Infektionen durch gram-negative Bakterien auf die Strahlensensibilität von verschiedenen Lungenkarzinom-Zelllinien auswirken.

## 2 Fragestellung

Aufgrund der hohen Inzidenz und Prävalenz stellt das Lungenkarzinom weltweit eine der bedeutendsten Krebserkrankungen dar. Der enorme Stellenwert der Strahlentherapie in der Behandlung wird dadurch verdeutlicht, dass ein Großteil der Karzinome erst in fortgeschrittenen, inoperablen Stadien diagnostiziert wird. In Studien wurde gezeigt, dass neben den in den vorherigen Abschnitten erklärten Mechanismen die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren eine wesentliche Rolle in der Strahlenresistenz von Zellen spielen könnte (Liu et al. 2013) und gram-negative Infekte bei Patienten mit Lungenkarzinom überdurchschnittlich häufig diagnostiziert werden (Putinati et al. 1994). Ziel dieser Arbeit war es daher, in einer Zellkultur darzustellen, inwieweit sich die Strahlensensibilität unterschiedlicher Lungenkarzinom-Zelllinien unter Endotoxin-Inkubation beeinflussen lässt. Hierfür wurden die Adenokarzinomzelllinien A549 und H23 und die Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 verwendet. Da Endotoxin den wichtigsten Pathogenitätsfaktor gram-negativer Bakterien darstellt, wurde es den Zellen in gereinigter Form zugesetzt. Nach Bestrahlung der Endotoxin-exponierten Zellen mit einem Linearbeschleuniger wurde die reproduktive Integrität der Tumorzelllinien untersucht.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Bewirkt LPS eine Steigerung des klonogenen Überlebens an unbestrahlten A549-, H23- und H226-Zellen?
2. Bewirkt LPS eine Veränderung der Ansprache auf Strahlentherapie anhand der Quantifizierung des klonogenen Überlebens?
3. Unterscheiden sich die Zelllinien hinsichtlich ihrer Strahlensensibilität voneinander?
4. Sind weitere Methoden geeignet, um die Strahlensensibilität der verwendeten Zelllinien und eine etwaige Veränderung der Ansprache auf Strahlentherapie durch LPS zu quantifizieren?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

|                               |                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Inkubator Hera Cell 150       | Firma Heraeus, Hanau                |
| Zentrifuge Typ Rotanta/AP     | Firma Hettich, Tuttlingen           |
| Sterilbank, MSC Advantage     | Firma Thermo Fisher Scientific, USA |
| Binokular                     | Firma Leica, Wetzlar                |
| Mikroskop, Olympus            | Firma Hund, Wetzlar                 |
| CASY Model TT                 | Firma Roche, USA                    |
| ELISA Reader Multiskan RC     |                                     |
| Elektronenlinearbeschleuniger | Firma Elekta, Schweden              |

##### 3.1.2 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

|          |                        |
|----------|------------------------|
| A549     | Adenokarzinom          |
| NCI-H23  | Adenokarzinom          |
| NCI-H226 | Plattenepithelkarzinom |

##### 3.1.3 Zellkulturmaterial

|                                                            |                        |
|------------------------------------------------------------|------------------------|
| DPBS                                                       | Firma PAN Biotech      |
| DMEMF 12                                                   | Firma Gibco            |
| Falcons 50 ml                                              | Firma BD               |
| Fetales Kälberserum (FCS)                                  | Firma Sigma            |
| Glutamin                                                   | Firma PAN Biotech      |
| Hepes 0,2 M                                                | Firma Roth             |
| NaCl 0,9%                                                  | Firma Braun            |
| Neubauer Zählkammer                                        | Firma Braun, Melsungen |
| Nichtessenzielle Aminosäuren (NEAA)                        | Firma Gibco            |
| Pen/Strep                                                  | Firma PAN Biotech      |
| Pipetten                                                   | Firma Eppendorf        |
| Sterifilter, Express plus, 0,22 µm                         | Firma Millipore        |
| Trypsin 2,5%                                               | Firma PAN Biotech      |
| Vitamin                                                    | Firma Gibco            |
| Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> , 25 cm <sup>2</sup> | Firma Greiner          |
| 6-well-, 24-well und 96-well Platten                       | Firma Greiner          |

### 3.1.4 Chemikalien, Kits und Sonstiges

|                                    |                  |
|------------------------------------|------------------|
| Kristallviolett                    | Firma Sigma      |
| LPS: E.coli 0111:B4                | Firma Sigma      |
| Casyton                            | Firma Roche, USA |
| Cell Titer 96 AQueous One Solution | Firma Promega    |
| Cell Proliferation Assay           |                  |

### 3.1.5 Lösungen

A549-Vollmedium

|               |        |
|---------------|--------|
| DMEMF 12      | 500 ml |
| 10 % FCS      | 58 ml  |
| 1 % Glutamin  | 5,8 ml |
| 1 % Pen/Strep | 5,8 ml |
| 1 % Vitamine  | 5,8 ml |
| 1 % NEAA      | 5,8 ml |

Trypsin-Lösung

|              |       |
|--------------|-------|
| Trypsin 2,5% | 12ml  |
| 0,2 M Hepes  | 12 ml |
| NaCl 0,9%    | 96 ml |

Stop-Solution für CASY-Messungen

20% FCS in PBS

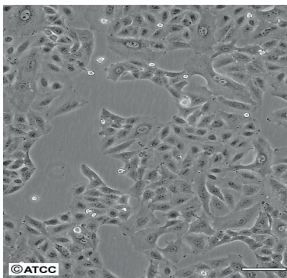
|      |       |
|------|-------|
| FCS  | 2 ml  |
| DPBS | 10 ml |

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Zelllinie A549

Die menschliche Adenokarzinom-Zelllinie A549 wurde 1972 aus einem primären Lungenkarzinom eines kaukasischen 58-jährigen Mannes isoliert. Die einen hypotriploiden Chromosomensatz aufweisenden NSCLC-Zellen besitzen eine Modalzahl von 66, was bedeutet, dass in den Zellen im Durchschnitt am häufigsten 66 Chromosomen vorliegen. Das Wachstumsverhalten dieser Zelllinie ist adhärent bei einer durchschnittlichen Verdopplungszeit der Population von 22 Stunden. A549-Zellen exprimieren das Tumorsuppressorgen p53 als Wildtyp. Ebenfalls konnte in Versuchen in diesen Zellen eine Mutation des Onkogens KRAS nachgewiesen werden (Valenzuela und Groffen 1986). Eine Überexpression von EGFR-Rezeptoren und HER-2 wurde ebenso beschrieben.



**Abbildung 3.1:**  
Präkonfluente A549 Zellen in Kultur

Quelle: ATCC

#### 3.2.1.2 Zelllinie H23

Die Adenokarzinom-Zelllinie H23 wurde aus dem primären Lungenkarzinom eines 51-jährigen, dunkelhäutigen Mannes isoliert, bevor dieser chemotherapeutisch behandelt wurde. Diese Zellen weisen eine Vielzahl an genetischen Veränderungen auf: Es besteht eine Mutation des p53- Tumorsuppressorgens (Takahashi et al. 1989), das Onkogen KRAS wird als Wildtyp exprimiert. Innerhalb dieser Zelllinie wird mRNA sowohl für PDGF und TGF  $\alpha$  und  $\beta$  als auch für EGFR exprimiert.

Das Wachstum dieser Zellen verhält sich adhärent bei einer Verdopplungszeit der Population von etwa 38 Stunden.

#### 3.2.1.3 Zelllinie H226

Die in den Versuchen verwendete NSCLC-Zelllinie H226 wurde 1980 aus einem malignen Pleuraerguss eines Mannes isoliert und histologisch als



Plattenepithelkarzinom identifiziert. Die Zellen weisen ebenso wie die Zelllinien H23 eine p53-Mutation sowie ein adhärentes Wachstum auf und besitzen jedoch im Vergleich eine längere Verdopplungszeit der Population um 61 Stunden.

| Zelle                                                                                                                                                          | Wachstumsart | Verdopplungszeit | Mutation                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|----------------------------------|
| <b>A549</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Adenokarzinom, Primärtumor isoliert aus 58-jährigem Mann</li> <li>Hypotriploider Chromosomensatz</li> </ul> | adhärent     | 22 Stunden       | KRAS<br>Expression von u.a. EGFR |
| <b>NCI-H23</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Adenokarzinom, Primärtumor isoliert aus 51-jährigem Mann</li> </ul>                                      | adhärent     | 38 Stunden       | p53<br>Expression von u.a. EGFR  |
| <b>NCI-H226</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Plattenepithelkarzinom, isoliert aus dem malignen Pleuraerguss eines Mannes</li> </ul>                  | adhärent     | 61 Stunden       | p53                              |

**Tabelle 3.1:**

Tabellarische Darstellung der drei Zelllinien und ihre wesentlichen Eigenschaften als Grundlage dieser Arbeit

### 3.2.1.4 Kultivierung der Zelllinien

Alle drei beschriebenen Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit 12 ml des entsprechenden Mediums bei 37 °C mit in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in einem Hera Cell 150 Inkubator der Firma Heraeus kultiviert. Alle Arbeiten und Versuche mit und an den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank durchgeführt.

Routinemäßig wurden alle Zelllinien in DMEM/F 12 Medium kultiviert, welches mit 1% nichtessenziellen Aminosäuren (NEAA), 1% Vitaminen, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin sowie 10% fetalem Kälberserum (FCS) supplementiert wurde (A549-Vollmedium). Zur Kultivierung wurden die Zellen in standardmäßig mit Poly-L-Lysin beschichtete 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen der Firma Greiner ausgesät und unter oben genannten Bedingungen inkubiert.

Die Subkultivierung und Umsetzung in neue Zellkulturgefäße erfolgte nach Erreichen eines präkonfluenten Zellrasens oder bei deutlich erkennbarer Farbveränderung des Mediums. Um die Zellen zu splitten und erneut auszusäen, wurden diese zunächst mit DPBS gründlich gewaschen und schließlich mit ca. 4 ml Trypsin 0,25% für 2 min

inkubiert. Durch die Wirkung des Trypsins wurden die adhärenenten Zellen vom Boden gelöst und Zell-Zell-Kontakte getrennt, sodass die Zellen nun in abgekugelter Form vereinzelt vorlagen. Die nun in Suspension befindlichen Zellen wurden mit wenig FCS versetzt um die Reaktion des Trypsins zu stoppen und eine weitere Proteolyse zu verhindern. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer und nach Zentrifugation wurden ca. 1-2 Mio. Zellen in einer neuen Zellkulturflasche unter Zugabe von Vollmedium kultiviert.

Grundlage aller Versuche war die Inkubation der Zelllinien mit 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS von E. coli. Bei jeder der im Folgenden beschriebenen Methoden wurden die Zellen stets in Vollmedium kultiviert.

### **3.2.2 Bestrahlung der Zelllinien**

Zur Zellbestrahlung wurde der Elektronenlinearbeschleuniger Elekta Synergy der Firma Elekta genutzt, welcher 6 MV ultraharte Röntgenstrahlung emittiert.

Bei jedem durchgeführten Bestrahlungsexperiment wurden die Zellen bereits am Vortag in die entsprechenden Platten ausgesät und am Tag der Bestrahlung etwa eine Stunde zuvor mit LPS von E.coli inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt eines Versuches wurden ebenfalls Zellen als unbestrahlte Kontrollgruppe ausgesät. Um in etwa gleiche Versuchsbedingungen zwischen den bestrahlten und den nicht bestrahlten Kontrollzellen zu schaffen, wurden die Kontrollzellen während der Zeit der Bestrahlung ebenfalls aus dem Inkubator entfernt und zum Linearbeschleuniger transportiert.

Die Zellplatten wurden in 100 cm Entfernung von der Strahlenquelle auf 5 10 mm dicken RW3 Platten (wasseräquivalente Platten) positioniert. Unter Berücksichtigung des Bestrahlungsprotokolls können folgende Angaben gemacht werden: Bestrahlt wurde mit 6 MV ultraharten Röntgenstrahlen mit einer Gesamtdosis von 6 bzw. 2 Gy bei einem Fokus-Haut-Abstand von 100 cm und einer Feldgröße von 20 cm \* 20 cm. Die Dosistiefe betrug 5 cm, wobei die Verschiebung des Dosismaximums in die Tiefe, die durch den Aufbaueffekt verursacht wird, beim Versuchsaufbau berücksichtigt wurde. Durch Schwenken der Gantry des Elektronenlinearbeschleunigers um 360° wurde die Strahlenquelle unterhalb des Tisches positioniert und die Zellen somit von unten bestrahlt.

### **3.2.3 Koloniebildungstest**

Der Koloniebildungstest stellt den Goldstandard zur Beurteilung der reproduktiven Integrität in vitro dar und beruht auf der Tatsache, dass die durch Bestrahlung ausgelösten Zellveränderungen mit einem Verlust der Koloniebildungsfähigkeit

einhergehen (Herrmann et al. 2006). Die Klonogenität der Zellen wurde daher anhand des Koloniebildungstests nach Puck und Marcus untersucht (Puck und Marcus 1956). Für jede Zelllinie wurde in Vorversuchen die geeignete auszusäende Zellzahl ermittelt, die nach Auswertung sowohl der bestrahlten als auch der unbestrahlten Zellen eine Anzahl von mindestens 25 Kolonien pro well ergeben sollte.

Am Vortag der Bestrahlung wurden die Zellen in definierter Anzahl in 6-well Platten ausgesät. Die Zelllinie H23 erwies sich als höchst strahlensensibel. Dies war unter anderem dadurch erkennbar, dass post Radiatio die Kolonien in den 6-well Platten aufgrund sehr wenig zusammenhängender Zellverbände nur schlecht zu beurteilen waren. Erkennbar war eine Vielzahl einzelner, vergrößerter Zellen, sodass für alle weiteren Koloniebildungstests der Zelllinie H23 zur besseren Beurteilbarkeit 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen benutzt wurden. Eine Stunde vor Bestrahlung wurden jeweils drei Wells bzw. die entsprechenden Zellkulturflaschen der Zelllinie H23 mit 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml Endotoxin von *E. coli* inkubiert. Die zu jedem Zeitpunkt existierende unbestrahlte Kontrollgruppe wurde während des Bestrahlungsvorganges aus dem Inkubator entfernt. Die Bestrahlung erfolgte mit Dosen von 2 und 6 Gy Photonen. Zur Beurteilung eines Versuches (n=1) wurden für jede LPS-Dosis insgesamt drei Wells der 6-well Platte herangezogen.

Nach Bestrahlung wurden die Zelllinien A549 und H23 für 10 Tage, die Zelllinie H226 aufgrund der langsameren Verdopplungszeit für insgesamt 14 Tage inkubiert, wobei alle 2-3 Tage ein Wechsel von Endotoxin und Medium erfolgte. Nach oben genanntem Zeitraum wurden die Experimente gestoppt und die Zellen zur makroskopischen Auswertung mit Kristallviolett-Lösung eingefärbt, anschließend gewaschen und luftgetrocknet. Schließlich wurde die Koloniebildung mit Hilfe eines Binokulars der Firma Leica beurteilt, wobei eine Kolonie als ein Zellverband definiert wurde, der aus 50 zusammenhängenden Tochterzellen bestand.

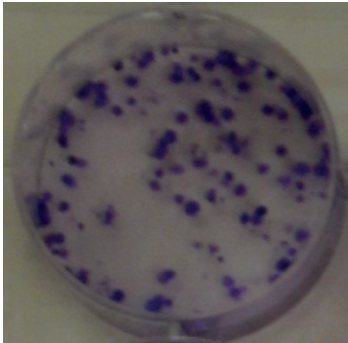
Die Koloniebildungsfähigkeit aller drei Zelllinien wurde anhand zweier wesentlicher Parameter ermittelt: Zunächst wurde die Plattierungseffizienz (Plating Efficiency, PE) berechnet, indem der Quotient aus der Zahl der nach Auswertung vorhandenen Kolonien und der tatsächlich ausgesäten Zellzahl gebildet wurde.

$$PE = \frac{\text{(Anzahl der nach Auswertung vorhandenen Kolonien)}}{\text{(Tatsächlich ausgesäte Zellzahl)}}$$

Anhand der PE wurde nun das relative Zellüberleben ermittelt, indem zur Berechnung der Surviving Fraction (SF) der Quotient aus der Koloniezahl der bestrahlten Zellen und der Koloniezahl der unbestrahlten Kontrollgruppe ermittelt wurde.

$$SF = \frac{(\text{Koloniezahl der bestrahlten Zellen})}{(\text{Koloniezahl der unbestrahlten Zellen})} \times 100$$

Nach Berechnung der genannten Parameter wurde anhand des Linear-Quadratischen Modelles (LQ-Modell, siehe Einleitung) eine Überlebenskurve für jede Zelllinie unter Berücksichtigung der entsprechenden Strahlendosen erstellt.



**Abbildung 3.2:**

Beispiel für einen Koloniebildungstest der Zelllinie A549.  
Dargestellt ist ein unbestrahltes Kontroll-Well ohne Inkubation mit LPS.

### 3.2.4 Zellzählung

Um das Proliferationsverhalten der bestrahlten Zellen mit den unbestrahlten Zellen vergleichen und Rückschlüsse auf das Zellüberleben schließen zu können, wurde in den Experimenten die genaue Zellzahl mit dem „Cell Counter + Analyser System“ (CASY Model TT, Firma Roche) ermittelt.

Die Methode der Zellzählung mittels CASY funktioniert nach dem Widerstandsmessprinzip, wobei die sich in einer isotonen Elektrolytlösung befindlichen Zellen über eine Messkapillare, die aufgrund zweier Platinelektroden unter elektrischer Spannung steht, angesaugt werden. Die gelösten Zellen führen durch Änderung des Widerstandes zur Generierung von elektrischen Impulsen. Bei intakter Zellmembran wird der elektrische Strom ausgeschlossen und ein vom Volumen der Zelle abhängiges Signal entsteht. Die so entstehende Anzahl von Impulsen entspricht somit der Zellzahl einer Probe. Anhand einer sogenannten Pulsflächenanalyse können bei dieser Methode

vitale von toten Zellen unterschieden werden. Tote Zellen können bei nicht mehr intakter Zellmembran den elektrischen Strom nicht mehr ausschließen und werden daher mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst. Anhand dieser Methode können so auch Zelldebris und größerer Zellcluster erkannt werden.

Am Vortag der Bestrahlung wurden die Zellen auf 24-well Platten ausgesät, wobei pro zu untersuchender LPS-Dosierung zwei Wells ausgewertet wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte auch während des Versuches stets in Vollmedium. Pro well wurden bei Versuchen mit den Zelllinien A549 und H23 10000 Zellen ausgesät. Bei Experimenten mit der Zelllinie H226 wurden aufgrund der längeren Verdopplungszeit 15000 Zellen pro well verwendet. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen eine Stunde vor Bestrahlung mit 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS inkubiert. Die Bestrahlung wurde nach oben beschriebenen Parametern an allen Zelllinien mit einer Energiedosis von 6 Gy durchgeführt.

Die Messungen wurden nach 8, 24 und 48 Stunden durchgeführt, wobei nach Auswertung einiger Versuche der Zeitpunkt nach 8 Stunden aufgrund wenig aussagekräftiger Ergebnisse verlassen wurde. Zur Vorbereitung der Messungen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen und anschließend unter Zugabe von 100 µl Trypsin für 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Ablösung der Zellen vom Boden wurde anhand eines Mikroskops der Firma Leica kontrolliert und durch vorsichtiges Beklopfen der Platten gefördert. Durch Zugabe einer definierten Menge aus 20% FCS und DPBS bestehender Stop-Solution wurde die Reaktion des Trypsins beendet. 100 µl der Zellen des zu messenden Wells wurden nach gründlicher Resuspendierung in isotonische Casyton-Lösung gegeben und die genaue Zellzahl pro well konnte nach oben beschriebenem Prinzip mittels CASY ermittelt werden.

Proliferationsverhalten und Zellüberleben wurden ausgewertet, indem der prozentuale Anteil von überlebenden bestrahlten Zellen zu überlebenden unbestrahlten Zellen berechnet wurde. Dies wurde wie auch beim Koloniebildungstest als SF oder Surviving Fraction bezeichnet.

$$SF = \frac{(\text{Anzahl der überlebenden bestrahlten Zellen})}{(\text{Anzahl der überlebenden unbestrahlten Zellen})} \times 100$$

### 3.2.5 Bestimmung der Zellproliferation und des Zellüberlebens anhand des MTS-Assays

Ebenfalls zur Bestimmung der Zellzahl wurde als weitere Methode der MTS-Assay „Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ der Firma Promega verwendet.

Bei dieser Methode wird die Zellzahl jedoch nicht direkt, sondern kolorimetrisch bestimmt. Mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen reduzieren das Reagenz dieses Assays (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)) in den bräunlich-violetten Farbstoff Formazan, welcher wasserlöslich ist und bei einem Absorptionsmaximum von 490 nm quantifiziert werden kann (Sittampalam et al. 2013; Malich et al. 1997).

Diese Methode wurde nur bei den Zelllinien A549 und H23 und einer Strahlendosis von 6 Gy angewendet und danach zugunsten der aussagekräftigeren anderen Methoden verlassen. Am Vortag der Bestrahlung wurden je 1000 Zellen pro well auf eine 96-well Platte ausgesät und in 200 µl Vollmedium kultiviert. Pro Zelllinie und Platte wurden insgesamt sechs Kontrollwells und je drei Wells pro LPS-Konzentration verwendet. Ebenso wie bei den anderen Methoden wurden die Zellen eine Stunde vor Radiatio mit LPS inkubiert. Während der Bestrahlung wurden die unbestrahlten Kontrollzellen ebenfalls aus dem Inkubator entfernt, um ähnliche Versuchsbedingungen zu schaffen. Die Messzeitpunkte wurden auf 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung festgelegt. Durch Zugabe von 25 µl MTS unter lichtgeschützten Bedingungen und weiterer Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden entstand der bräunlich-violette Farbstoff Formazan, dessen optische Dichte bei 490 nm mittels ELISA Reader quantifiziert wurde. Die Quantifizierung der optischen Dichte stellt ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen dar, die direkt proportional zur tatsächlichen Zellzahl ist (Cory et al. 1991).

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens und der SF wurde die optische Dichte der bestrahlten Zellen zur optischen Dichte der unbestrahlten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

$$SF = \frac{(\text{Optische Dichte der bestrahlten Zellen})}{(\text{Optische Dichte der unbestrahlten Zellen})} \times 100$$

### 3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Koloniebildungstests und Darstellung von Überlebenskurven erfolgte mit der Software GraphPad Prism 7.0. Die Zellüberlebenskurven wurden anhand des Linear-Quadratischen Modells erstellt. Sämtliche Stichproben wurden nach D'Agostino und Pearson auf Normalverteilung getestet.

Ebenfalls wurden die Mittelwerte der Surviving Fraction unter den verschiedenen LPS-Konzentrationen dargestellt. Grafiken und Statistik wurden auch hier mit der Software Graph Pad Prism 7.0 erstellt und zur Überprüfung der Signifikanz nach Überprüfung der Normalverteilung ein ungepaarter T-Test durchgeführt.

Im Falle einer nichtvorhandenen Gauß'schen Normalverteilung wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test angewendet.

Sowohl Statistik und Ergebnisse der Versuche mittels Zellzählung als auch Statistik und Ergebnisse der Experimente anhand des MTS-Assays wurden ebenfalls mit Hilfe von GraphPad Prism 7.0 berechnet und dargestellt. In Grafiken wurden die Mittelwerte der Surviving Fraction (SF) unter den verschiedenen LPS-Konzentrationen veranschaulicht und die statistischen Signifikanzen ebenfalls durch einen ungepaarten T-Test überprüft. Bei fehlender Normalverteilung wurde auch hier der Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Zur Auswertung der Experimente wurde stets eine Mindestanzahl von 5 Versuchen ( $n=5$ ) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

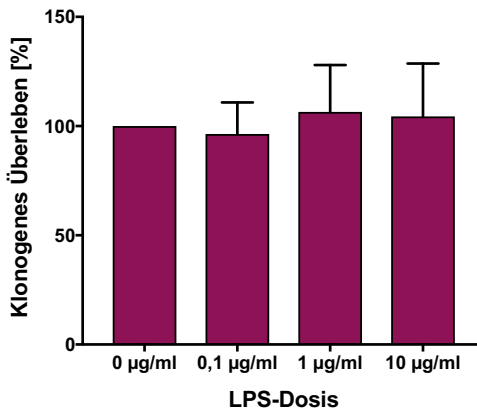
Ziel dieser Arbeit war es, sowohl an den beiden Adenokarzinom-Zelllinien A549 und H23, als auch an der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H226 zu untersuchen, inwieweit sich unter Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Endotoxin in vitro die Strahlensensibilität verändert. Alle drei Zelllinien wurden entweder unbestrahlt belassen oder mit 2 und 6 Gy bestrahlt und die Ergebnisse mit Hilfe eines Koloniebildungstests gewonnen, welcher den Goldstandard in der Beurteilung der Strahlensensibilität darstellt. Des Weiteren wurde an allen drei Zelllinien nach Bestrahlung mit 6 Gy eine automatisierte Zellzählung im Casy® Cell Counter durchgeführt. Zur Beurteilung der Zellproliferation anhand der Stoffwechselaktivität wurde an den Adenokarzinom-Zelllinien A549 und H23 auch der MTS Assay durchgeführt. Da sich diese Methode als ungeeignet erwies, um überhaupt einen Bestrahlungseffekt zu zeigen, wurde sie zugunsten der anderen Methoden verlassen. Auf die einzelnen Methoden wurde bereits im Abschnitt Material und Methoden näher eingegangen.



#### 4.1 Ergebnisse der NSCLC-Zelllinie A549

Der Koloniebildungstest stellt den Goldstandard in der Beurteilung der Strahlensensibilität dar. Die Zellen wurden mit 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS inkubiert und mit einer Dosis von 2 und 6 Gy bestrahlt. Nach 10 Tagen weiterer Inkubation wurden die bestrahlten Zellen mit einer nicht bestrahlten Kontrollgruppe verglichen.

##### 4.1.1 LPS bewirkt keine signifikante Steigerung des klonogenen Überlebens an unbestrahlten A549 Zellen

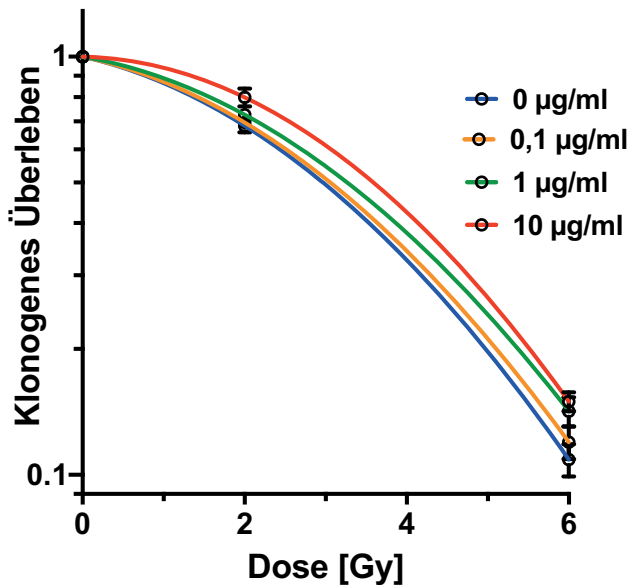


**Abbildung 4.1:**  
Die LPS-Wirkung auf das klonogene Überleben der unbestrahlten A549 Zellen

Es wurden 75 Zellen pro well auf einer 6-well Platte ausgesät und mit den unterschiedlichen Konzentrationen LPS über 10 Tage inkubiert. Nach 10 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Berechnet wurde schließlich die Plattierungseffizienz (Anzahl Kolonien/ausgesäte Zellen). Der durch LPS induzierte Anstieg des klonogenen Überlebens wurde prozentual in Bezug zur Kontrolle (100%) dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test überprüft

Anhand von Abbildung 4.1 ist keine Zunahme des klonogenen Überlebens an unbestrahlten A549 Zellen unter 0,1, 1 und 10 µg/ml LPS erkennbar. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde nach Auszählung der Kolonien die Plattierungseffizienz berechnet (Anzahl der Kolonien/ausgesäte Zellen). Zur besserer Darstellbarkeit wurde der durch LPS induzierte prozentuale Anstieg des klonogenen Überlebens berechnet und in Form eines Säulendiagrammes mit zugehöriger Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) gezeigt. Es zeigt sich hierbei keine signifikante Zunahme des klonogenen Überlebens.

#### 4.1.2 Unter Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy lässt sich unter LPS-Inkubation eine Zunahme des klonogenen Überlebens beobachten



**Abbildung 4.2: Dosis-Wirkungskurve A549**

Das klonogene Überleben der A549 Zelllinie in halblogarithmischer Form unter Inkubation mit unterschiedlichen Dosen LPS und unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy als Dosis-Wirkungs-Kurve.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde bei dieser Methode stets das klonogene Überleben berechnet, welches das prozentuale Verhältnis von nach Bestrahlung vorhandenen Kolonien im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe darstellt.

Zur Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 4.2 wurden die Überlebenskurven der Zellen in halblogarithmischer Form aufgetragen. Das klonogene Überleben der mit LPS-behandelten Zellen liegt deutlich über der unbehandelten Kontrolle.

#### 4.1.3 Endotoxin-Effekt auf das klonogene Überleben der A549 Zellen unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy

Um die Wirkung von Endotoxin bei den unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten differenziell zu betrachten, wird das klonogene Überleben im Folgenden noch einmal bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy und von 6 Gy getrennt dargestellt.

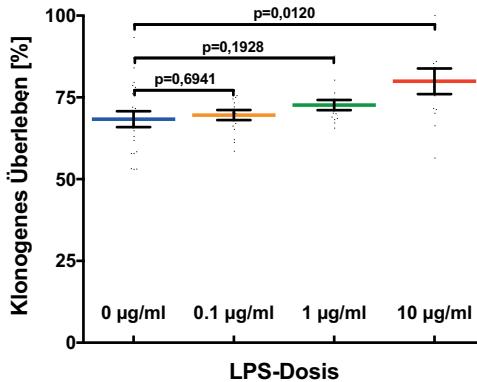
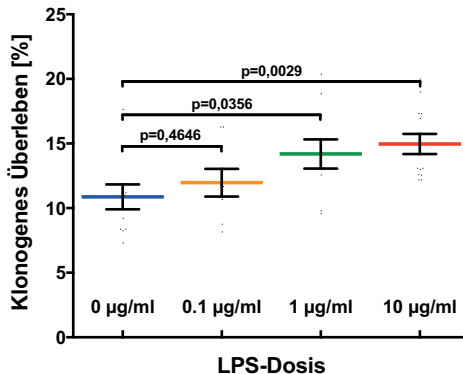


Abbildung 4.3:

**Klonogenes Überleben der Zelllinie A549 in % nach Bestrahlung mit 2 Gy.**

75 Zellen (Kontrolle) bzw. 125 Zellen (bestrahlte Zellen) wurden pro well in einer 6-well Platte in 2 ml Nährmedium ausgesät und mit den beschriebenen LPS-Dosen stimuliert. Nach der LPS-Stimulation erfolgte eine Photonenbestrahlung mit 2 Gy oder die Zellen wurden keiner Radiatio unterzogen. Nach 10 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Dargestellt ist das klonogene Überleben in % in Bezug auf die unbestrahlte Kontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test überprüft, wobei sich eine signifikante Steigerung des klonogenen Überlebens nach Stimulation mit 10 µl/ml LPS zeigt.

Betrachtet man die in der Abbildung 4.3 dargestellten Ergebnisse, die das klonogene Überleben der Adenokarzinom-Zelllinie A549 nach Bestrahlung mit 2 Gy darstellen, so ist erkennbar, dass unter Inkubation der Zellen mit Endotoxin eine Abnahme der Strahlensensibilität erfolgte. Bei Inkubation mit einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml fiel die Steigerung des klonogenen Überlebens am größten aus, es konnte ein Anstieg von 68,4 auf 80% gezeigt werden. In der statistischen Auswertung mittels t-Test erwies sich die Zunahme der Strahlenresistenz unter einer LPS-Dosis von 10 µg/ml signifikant.



**Abbildung 4.4: Klonogenes Überleben der Zelllinie A549 in % nach Bestrahlung mit 6 Gy.**

75 Zellen (Kontrolle) bzw. 375 Zellen (bestrahlte Zellen) wurden pro well in einer 6-well Platte in 2 ml Nährmedium ausgesät und mit den beschriebenen LPS-Dosen stimuliert. Nach der LPS-Stimulation erfolgte eine Photonenbestrahlung mit 6 Gy oder die Zellen wurden keiner Radiatio unterzogen. Nach 10 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Dargestellt ist das klonogene Überleben in % in Bezug auf die unbestrahlte Kontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test überprüft.

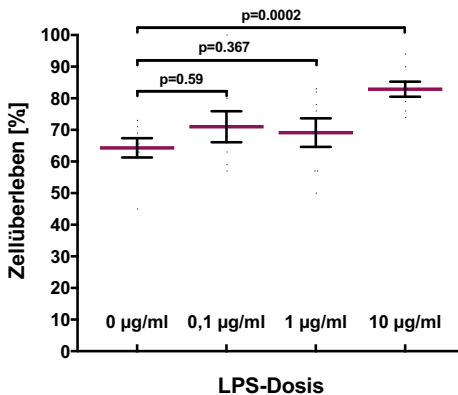
Betrachtet man die in Abbildung 4.4 dargestellten Ergebnisse, so ist auch hier erkennbar, dass unter Bestrahlung mit 6 Gy eine Zunahme der Strahlenresistenz messbar ist. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde hier ebenfalls wieder das klonogene Überleben, das prozentuale Überleben im Verhältnis von bestrahlten zu nicht bestrahlten Zellen, dargestellt. Hier wird erkennbar, dass unter einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml eine Zunahme des klonogenen Überlebens von 10,8% auf 15% stattgefunden hat. Diese gleichbedeutende Abnahme der Strahlensensibilität erwies sich unter Endotoxin-Dosen von 1 µg/ml und 10 µg/ml statistisch signifikant.

#### 4.1.4 In der Zellzählung ist eine Abnahme der Strahlensensibilität der A549 Zellen erkennbar

Ziel der Arbeit war es, nicht nur das klonogene Überleben zu untersuchen, sondern ebenfalls Rückschlüsse auf das kurzfristige Proliferationsverhalten der mit LPS inkubierten Zellen ziehen zu können. Die Ergebnisse wurden hierbei durch automatisierte Zellzählung gewonnen. Die Messungen an den zuvor mit 6 Gy bestrahlten Zellen wurden nach 24 und 48 Stunden durchgeführt. Näheres zu dieser Methode wird im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Grundlage der Auswertung war auch hier wieder das prozentuale Überleben von bestrahlten Zellen im Verhältnis zu den nicht bestrahlten Kontrollzellen. Betrachtet man die Ergebnisse nach 24 Stunden, ist lediglich bei der hohen LPS-Konzentration von 10

$\mu\text{g/ml}$  eine signifikante Abnahme der Strahlensensibilität um nahezu 20% zu verzeichnen. Bei niedrigeren LPS-Konzentrationen liegen die Werte zwar über der Kontrolle, unterscheiden sich aber nicht signifikant von dieser. Nach 48 Stunden zeigen die mit LPS behandelten Zellen eine geringere und nicht signifikante Abnahme der Strahlensensibilität, weswegen auf die graphische Darstellung dieser Werte verzichtet wurde

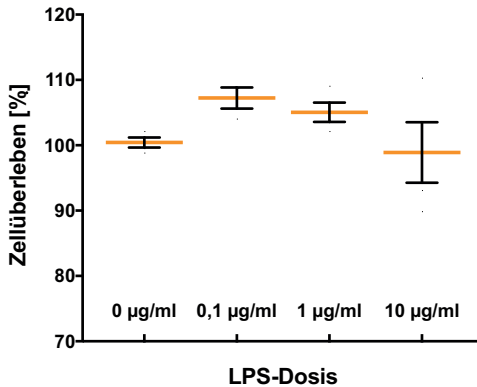


**Abbildung 4.5:**  
**Proliferationsverhalten der mit 6 Gy bestrahlten Zelllinie A549, ausgewertet anhand Zellzählung nach 24 h.**

10000 Zellen wurden je well auf einer 24-well Platte in 500  $\mu\text{l}$  Nährmedium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Eine Stunde vor Radiatio bzw. Nicht-Radiatio erfolgte die Stimulation mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. Die Zellen wurden nach erfolgter bzw. nicht erfolgter Bestrahlung für weitere 24 Stunden inkubiert. Schließlich wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und anschließend trypsiniert und diese Reaktion mit einer aus FCS hergestellten Stop-Solution beendet. Anschließend wurde die Zellzahl mittels automatisierter Zellzählung ermittelt. Dargestellt ist das prozentuale Überleben der Zellen nach Stimulation mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen in Bezug auf die nicht stimulierten Kontroll-Zellen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test überprüft.

#### 4.1.5 Im MTS-Assay kann keine Steigerung des Überlebens der A549 Zellen unter LPS-Inkubation gemessen werden

Anhand des kolorimetrischen MTS-Assays wurde mit Hilfe der gemessenen Stoffwechselaktivität Rückschluss auf das Überleben der mit LPS inkubierten, mit 6 Gy bestrahlten Zellen gezogen. Näheres zu dieser Methode wird im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Ergebnisse wurden auch hier nach 24 und 48 Stunden erhoben. Grundlage der Ergebnisse bildet die Berechnung des prozentualen Überlebens der bestrahlten Zellen im Vergleich zu der nicht bestrahlten Kontrollgruppe.



**Abbildung 4.6:**

**Prozentuales Überleben der A549 Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy im MTS – Assay nach 24 h.** 2000 Zellen wurden je Well auf einer 96-well Platte in 200 µl Nährmedium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen stimuliert und eine Stunde später einer Radiatio mit 6 Gy bzw. keiner Radiation ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation über 24 Stunden. 2 Stunden vor Messung erfolgte die Hinzugabe von 25 µl MTS-Lösung unter lichtgeschütztem Arbeiten. Dargestellt ist das prozentuale Überleben unter den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen nach Bestrahlung in Bezug auf die nicht stimulierten Kontroll-Zellen. Die Unterschiede wurden anhand des t-Tests überprüft.

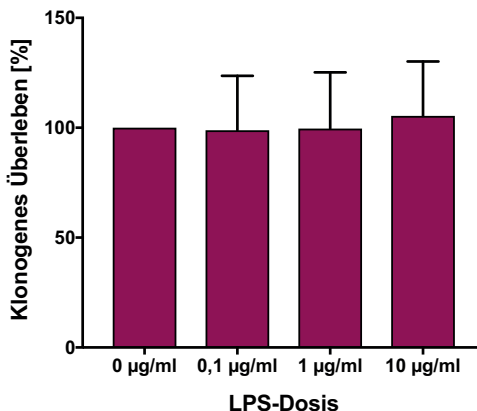
Da sich zeigte, dass die im MTS-Assay quantifizierte Stoffwechselaktivität der Zellen durch die Radiatio völlig unbeeinflusst blieb (nahezu 100% Überleben in der mit 6 Gy bestrahlten Kontrollgruppe) wurde diese Methode im Weiteren nicht mehr zur Beurteilung der Strahlensensibilität herangezogen. Auch die LPS-behandelten Zellen wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf.

## 4.2 Ergebnisse der NSCLC-Zelllinie H23

Zunächst wurde der Koloniebildungstest an der Adenokarzinom-Zelllinie H23 in der gleichen Art und Weise durchgeführt wie mit den A549 Zellen. Nach Auswertung der ersten Versuche konnte jedoch beobachtet werden, dass diese Zellart im Vergleich zu den A549 Zellen wesentlich strahlensensibler ist. Auch im Hinblick auf die Koloniebildung nach Bestrahlung der Zellen wurden wesentliche Unterschiede deutlich. Die einzelnen Zellen waren makroskopisch innerhalb eines Zellverbandes deutlich weniger zusammenhängend, sodass die Kolonien insgesamt aufgelockert erschienen. Viele der Zellen waren nach Bestrahlung nicht mehr in einem Zellverband organisiert, sodass neben den einzelnen Kolonien viele sehr voluminös erscheinende Einzelzellen darstellbar waren. Da diese Problematik zu Schwierigkeiten bei der Auswertung der Kolonien innerhalb der 6-well-Platten führte, wurden die H23 Zellen für alle weiteren Versuche in kleine Zellkulturflaschen ausgesät und in diesen bestrahlt. Bei der Auswertung waren die Kolonien nun makroskopisch besser zu definieren, da sich die nach Bestrahlung einzeln vorliegenden Zellen auf einer im Vergleich zur 6-well-Platte größeren Fläche verteilen konnten.

Die Adenokarzinom-Zelllinie H23 wurde ebenso wie die Zelllinie A549 mit den schon beschriebenen Konzentrationen LPS inkubiert und anschließend mit 2 Gy und 6 Gy bestrahlt. Die Auswertung der Versuche erfolgte wie auch bei den A549 Zellen nach 10 Tagen. Grundlage der Auswertung und Darstellung war auch hier die Berechnung des klonogenen Überlebens in Prozent.

### 4.2.1 LPS bewirkt keine Steigerung des klonogenen Überlebens an unbestrahlten H23 Zellen



**Abbildung 4.7:**  
Die LPS-Wirkung auf das klonogene Überleben der unbestrahlten H23 Zellen

Es wurden 100 Zellen pro T25 Kulturflasche ausgesät und mit den unterschiedlichen Konzentrationen LPS über 10 Tage inkubiert. Nach 10 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Berechnet wurde schließlich die Plattierungseffizienz (Anzahl Kolonien/ausgesäte Zellen). Der durch LPS induzierte Anstieg des klonogenen Überlebens wurde prozentual in Bezug zur Kontrolle (100%) dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels t-Test überprüft.

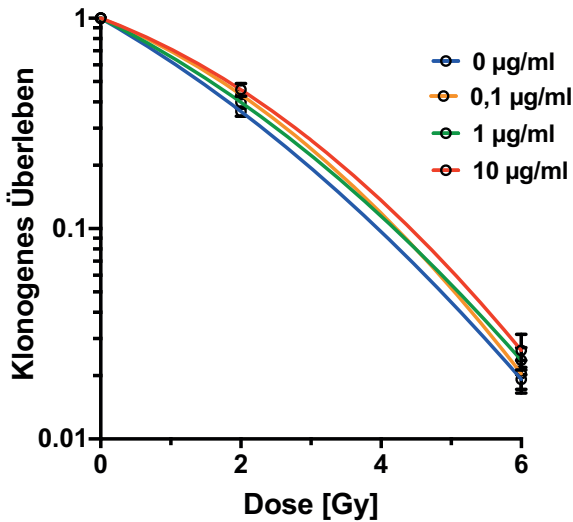
Abbildung 4.7 stellt die Wirkung von LPS auf das klonogene Überleben der unbestrahlten H23 Zellen dar. Endotoxin per se hat keinen Effekt auf das klonogene Überleben an H23 Zellen. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde nach Auszählung der Kolonien die Plattierungseffizienz berechnet (Anzahl der Kolonien/ausgesäte Zellen). Zwecks besserer Darstellbarkeit wurde die durch LPS induzierte prozentuale Veränderung des klonogenen Überlebens berechnet und in Form eines Säulendiagrammes mit zugehöriger SEM gezeigt. Es zeigt sich nach LPS Stimulation von 10 µg/ml ein geringer, nicht signifikanter, Anstieg des klonogenen Überlebens um etwa 5%.

#### **4.2.2 Nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy lässt sich unter LPS-Inkubation eine Zunahme des klonogenen Überlebens der H23 Zellen beobachten**

In Abbildung 4.8 sind die Dosis-Wirkungskurven der Zelllinie H23 unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy in halblogarithmischer Form dargestellt. Erkennbar ist, dass die Kurven der mit LPS stimulierten Zellen oberhalb der Kurve der unstimulierten Zellen verlaufen und somit das klonogene Überleben der stimulierten Zellen tendenziell erhöht ist.

Unter einer Bestrahlung von 2 Gy konnte bei Stimulation mit 1 µg/ml LPS und 0,1 µg/ml LPS zwar eine Zunahme der Strahlenresistenz gemessen werden, allerdings zeigte sich diese nach Inkubation mit 0,1 µg/ml gering stärker ausgeprägt. Nach Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich generell eine sehr starke Abnahme des klonogenen Überlebens.





**Abbildung 4.8:**

**Dosis-Wirkungskurve H23** Das klonogene Überleben der H23 Zelllinie in halblogarithmischer Form unter Inkubation mit unterschiedlichen Dosen LPS und unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy als Dosis-Wirkungs-Kurve.

#### 4.2.3 Endotoxin-Effekt auf das klonogene Überleben der H23 Zellen unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy

Um auch an der Zelllinie H23 die Endotoxinwirkung auf den Bestrahlungseffekt differenziell darzustellen, wird hier ebenfalls das klonogene Überleben nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy getrennt demonstriert.

Betrachtet man die dargestellten Ergebnisse in Abbildung 4.9, wird erkennbar, dass nach Bestrahlung mit 2 Gy schon unter Inkubation mit 0,1 µg/ml LPS eine Steigerung des klonogenen Überlebens erfolgt ist, die sich in der Überprüfung mittels t-Test allerdings als nicht statistisch signifikant erwies. Eine weitere Erhöhung der Endotoxin-Konzentration hatte an den H23 Zellen im Koloniebildungstest nur eine tendenzielle, statistisch ebenfalls nicht signifikante Steigerung des klonogenen Überlebens zur Folge.

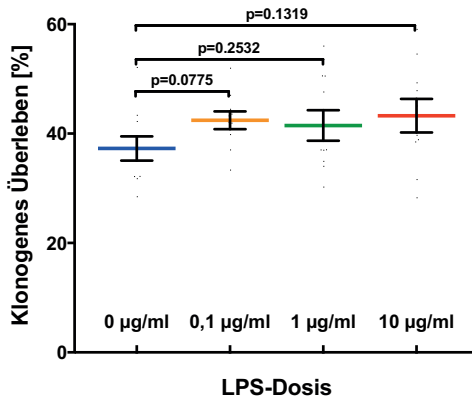


Abbildung 4.9:

**Klonogenes Überleben der Zelllinie H23 nach Bestrahlung mit 2 Gy.**

100 Zellen (Kontrolle) bzw. 300 Zellen (bestrahlte Zellen) wurden pro T 25 Kulturflasche in 3 ml Nährmedium ausgesät und mit den beschriebenen LPS-Dosen stimuliert. Nach der LPS-Stimulation erfolgte eine Photonenbestrahlung mit 2 Gy oder die Zellen wurden keiner Radiatio unterzogen. Nach 10 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Dargestellt ist das klonogene Überleben in % in Bezug auf die unbestrahlte Kontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels ungepaartem t-Test überprüft.

Die enorme Strahlensensibilität der Zelllinie H23 hatte zur Folge, dass bei Auswertung der Versuche nach einer Bestrahlung mit 6 Gy nur ein klonogenes Überleben in sehr geringen Prozentbereichen [1-4%] gemessen werden konnte.

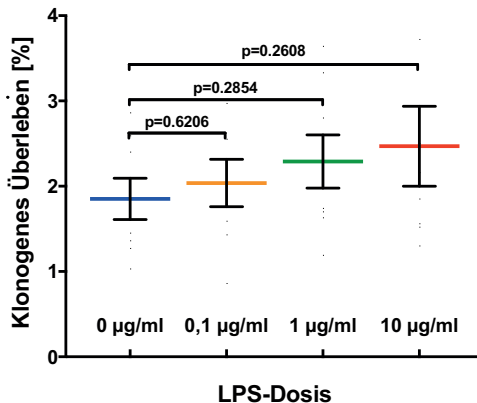


Abbildung 4.10: Klonogenes Überleben der Zelllinie H23 nach Bestrahlung mit 6 Gy.

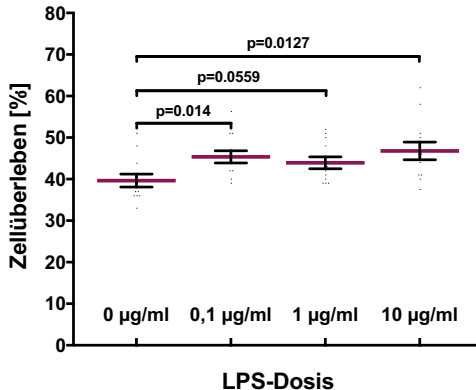
100 Zellen (Kontrolle) bzw. 1000 Zellen (bestrahlte Zellen) wurden pro T 25 Kulturfläschchen in 3 ml Nährmedium ausgesät und mit den beschriebenen LPS-Dosen stimuliert. Nach der LPS-Stimulation erfolgte eine Photonenbestrahlung mit 6 Gy oder die Zellen wurden keiner Radiatio unterzogen. Nach 10 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Dargestellt ist das klonogene Überleben in % in Bezug auf die unbestrahlte Kontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels ungepaartem t-Test überprüft.

Betrachtet man die dargestellten Ergebnisse in Abbildung 4.10, ist festzustellen, dass die nicht mit LPS inkubierten Kontrollzellen nach Bestrahlung mit 6 Gy nur ein klonogenes Überleben von etwa 2 % aufweisen. Unter LPS-Inkubation konnte eine nur in geringem Ausmaß ausfallende Steigerung des Überlebens gemessen werden. Die Reduktion der Strahlensensibilität fiel bei Inkubation mit 10 µg/ml LPS am größten aus; ein statistisch signifikanter Effekt zeigte sich jedoch nicht.

#### **4.2.4 Mittels Zellzählung ist nach 24 h eine Abnahme der Strahlensensibilität der H23 Zellen erkennbar**

An der Zelllinie H23 wurde nach Bestrahlung mit 6 Gy ebenfalls das Proliferationsverhalten mittels Zellzählung nach der gleichen Methode wie an den A549 Zellen untersucht. Grundlage der Darstellung der Ergebnisse ist hier wieder die Berechnung des prozentualen Überlebens von bestrahlten im Verhältnis zu den nicht bestrahlten Kontrollzellen.

Abbildung 4.11 stellt das Proliferationsverhalten der mit 6 Gy bestrahlten Zelllinie H23 unter Inkubation mit LPS nach 24 Stunden dar. Die Graphik verdeutlicht, dass zum Zeitpunkt nach 24 Stunden der deutlichste Anstieg des prozentualen Überlebens unter Inkubation mit 0,1 als auch mit 10 µg/ml LPS stattgefunden hat. Der Anstieg der Proliferation auf 47% unter einer Konzentration mit 0,1 µg/ml, aber auch die Proliferationszunahme nach Stimulation 10 µg/ml erwiesen sich mittels t-Test statistisch signifikant. Nach 48-stündiger Inkubation war dieser Effekt geringer ausgeprägt, weswegen auf die graphische Darstellung verzichtet wurde.



**Abbildung 4.11:**  
**Proliferationsverhalten der mit 6 Gy bestrahlten Zelllinie H23, ausgewertet anhand Zellzählung nach 24 h.**

10000 Zellen wurden je well auf einer 24-well Platte in 500 µl Nährmedium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Eine Stunde vor Radiatio bzw. Nicht-Radiatio erfolgte die Stimulation mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. Die Zellen wurden nach erfolgter bzw. nicht erfolgter Bestrahlung für weitere 24 Stunden inkubiert. Schließlich wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und anschließend trypsiniert und diese Reaktion mit einer aus FCS hergestellten Stop-Solution beendet. Anschließend wurde die Zellzahl mittels automatisierter Zellzählung ermittelt.

Dargestellt ist das prozentuale Überleben der Zellen nach Stimulation mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen in Bezug auf die nicht stimulierten Kontroll-Zellen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test berechnet.

#### 4.2.5 Im MTS-Assay kann keine Steigerung des Überlebens der mit 6 Gy bestrahlten H23 Zellen unter LPS-Inkubation gemessen werden

Wie bei der Zelllinie A549 wiesen die Ergebnisse nach Durchführung des MTS-Assays bei den H23 Zellen eine große Schwankungsbreite auf. Abbildung 4.12 verdeutlicht jedoch, dass nach 24 Stunden keine nennenswerte Steigerung der Proliferation unter Inkubation mit allen drei LPS-Konzentrationen stattgefunden hat. Die Steigerung der Proliferation wurde hier anhand der Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen, wobei sich am ehesten eine leichte Zunahme der Stoffwechselaktivität nach Inkubation mit 1 µg/ml Endotoxin zeigte. Aufgrund der hohen Schwankungsbreite konnte mittels t-Test keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

Trotz der mittels der anderen Methoden erkennbaren hohen Strahlensensibilität der H23-Zellen zeigte sich auch hier innerhalb der nicht mit Endotoxin inkubierten Kontrollgruppe ein prozentuales Überleben von über 90%.

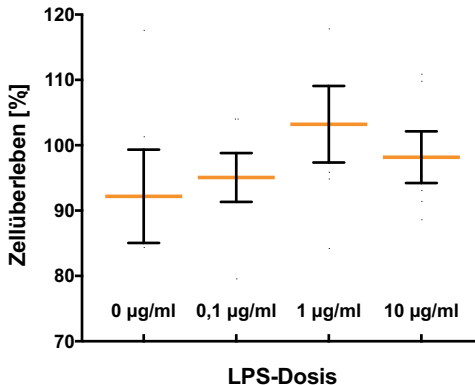


Abbildung 4.12:

**Prozentuales Überleben der H23 Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy im MTS-Assay nach 24 h.**

2000 Zellen wurden je well auf einer 96-well Platte in 200 µl Nährmedium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen stimuliert und eine Stunde später einer Radiation mit 6 Gy bzw. keiner Radiation ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation über 24 Stunden. 2 Stunden vor Messung erfolgte die Hinzugabe von 25 µl MTS-Lösung unter lichtgeschütztem Arbeiten. Dargestellt ist das prozentuale Überleben unter den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen nach Bestrahlung in Bezug auf die nicht stimulierten Kontroll-Zellen. Die Unterschiede wurden mittels t-Test überprüft.

### 4.3 Ergebnisse der NSCLC-Zelllinie H226

#### 4.3.1 LPS bewirkt keine Steigerung des klonogenen Überlebens an unbestrahlten H226 Zellen

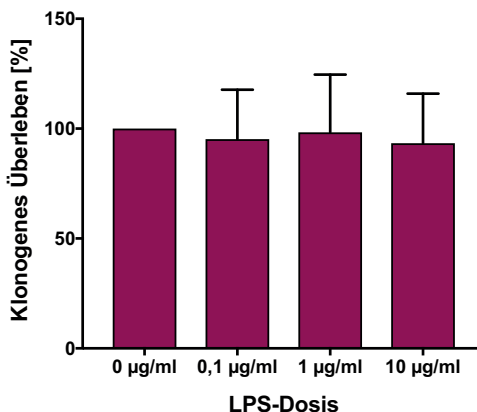


Abbildung 4.13:

**Die LPS-Wirkung auf das klonogene Überleben der unbestrahlten H226 Zellen**

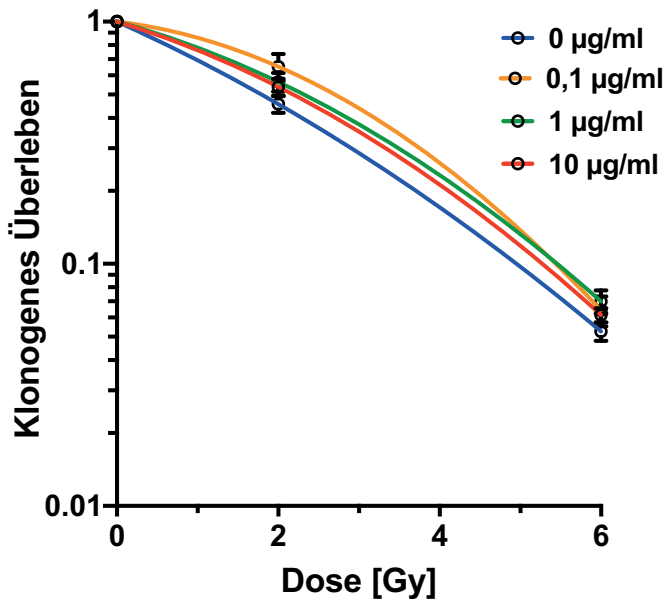
Es wurden 100 Zellen pro well auf einer 6-well Platte ausgesät und mit den unterschiedlichen Konzentrationen LPS über 14 Tage inkubiert. Nach 14 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Berechnet wurde schließlich die Plattierungseffizienz (Anzahl Kolonien/ausgesäte Zellen). Das durch LPS induzierte Verhalten des klonogenen Überlebens wurde prozentual in Bezug zur Kontrolle (100%) dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test überprüft.

Abbildung 4.13 verdeutlicht, dass an der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H226 keine Wirkung auf das klonogene Überlebens unter LPS Stimulation gezeigt werden kann. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde nach Auszählung der Kolonien die

Plattierungseffizienz berechnet (Anzahl der Kolonien/ausgesäte Zellen). Zwecks besserer Darstellbarkeit wurde der durch LPS induzierte prozentuale Anstieg des klonogenen Überlebens berechnet und in Form eines Säulendiagrammes mit zugehöriger SEM gezeigt. Unter allen dargestellten LPS-Dosierungen zeigte sich ein klonogenes Überleben von nahezu 100%.

#### 4.3.2 Endotoxin induziert sowohl nach Bestrahlung mit 2 Gy als auch mit 6 Gy eine Zunahme des klonogenen Überlebens

In Abbildung 4.14 sind die Dosis-Wirkungskurven der Zelllinie H226 unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy in halblogarithmischer Form dargestellt. Erkennbar ist, dass die Kurven der mit LPS stimulierten Zellen deutlich oberhalb der Kurve der unstimulierten Zellen verlaufen und somit das klonogene Überleben der stimulierten Zellen wesentlich erhöht ist. Insgesamt kann jedoch ein Maximum des klonogenen Überlebens unter 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS gezeigt werden.



**Abbildung 4.14: Dosis-Wirkungskurve H226**

Das klonogene Überleben der H226 Zelllinie in halblogarithmischer Form unter Inkubation mit unterschiedlichen Dosen LPS und unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy als Dosis-Wirkungs-Kurve.

Die Koloniebildungstests wurden an der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H226 nach derselben Methode durchgeführt und ausgewertet wie an der Adenokarzinom-Zelllinie A549. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde ebenso wie an den anderen Zelllinien das prozentuale klonogene Überleben berechnet.

#### **4.3.3 Endotoxin-Effekt auf das klonogene Überleben der H226 Zellen unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy**

Um den Effekt der LPS-Inkubation auf das klonogene Überleben nach Bestrahlung auch an den H226-Zellen darzustellen, wurden die Ergebnisse nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy ebenfalls getrennt dargestellt.

In den Abbildungen 4.15 und 4.16 wird deutlich, dass Endotoxin an den H226 Zellen sowohl unter Bestrahlung mit 2 Gy als auch mit 6 Gy eine Zunahme des klonogenen Überlebens auslöst. In beiden Graphiken ist der größte Anstieg der Proliferation unter 0,1 µg/ml LPS erkennbar, welcher sich nach Bestrahlung mit 2 Gy in der statistischen Auswertung mittels t-Test als signifikant erwies. Unter Endotoxin-Konzentrationen von 1 µg/ml und 10 µg/ml konnte in den Versuchen ein gegenüber den nicht mit LPS inkubierten Kontrollzellen geringerer Anstieg des klonogenen Überlebens festgehalten werden. Dabei wurde die im Vergleich zur Kontrollgruppe am wenigsten ausgeprägte Proliferationssteigerung bei Konzentrationen von 10 µg/ml LPS gemessen, welche sich jedoch nach Bestrahlung mit 6 Gy als statistisch signifikant erwies. Im Vergleich zur Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy zeigt Abbildung 4.16, dass unter Bestrahlung mit 6 Gy das klonogene Überleben sowohl der Kontrollzellen als auch der mit LPS inkubierten Zellen in etwa um den Faktor 10 reduziert ist.

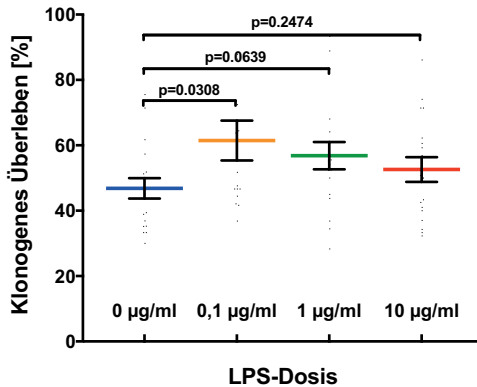


Abbildung 4.15:

**Klonogenes Überleben der Zelllinie H226 in % nach Bestrahlung mit 2 Gy.**

100 Zellen (Kontrolle) bzw. 300 Zellen (bestrahlte Zellen) wurden pro well auf einer 6-well Platte in 2 ml Nährmedium ausgesät und mit den beschriebenen LPS-Dosen stimuliert. Nach der LPS-Stimulation erfolgte eine Photonenbestrahlung mit 2 Gy oder die Zellen wurden keiner Radiatio unterzogen. Nach 14 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Dargestellt ist das klonogene Überleben in % in Bezug auf die unbestrahlte Kontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test überprüft. Die Steigerung des klonogenen Überlebens zeigte sich unter 0,1 µg/ml statistisch signifikant.

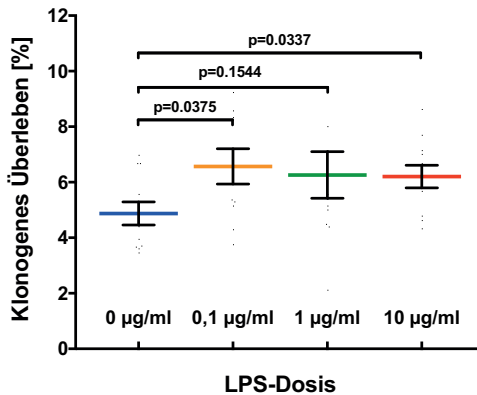


Abbildung 4.16:

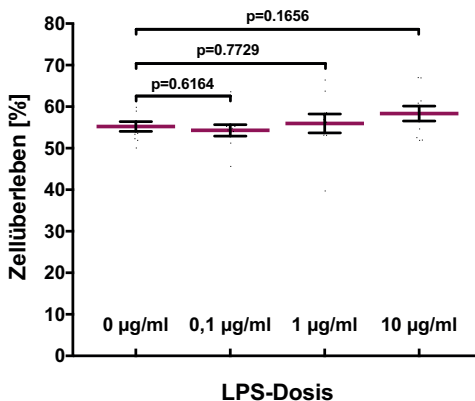
**Klonogenes Überleben der Zelllinie H226 in % nach Bestrahlung mit 6 Gy.**

100 Zellen (Kontrolle) bzw. 1000 Zellen (bestrahlte Zellen) wurden pro well auf einer 6-well Platte in 2 ml Nährmedium ausgesät und mit den beschriebenen LPS-Dosen stimuliert. Nach der LPS-Stimulation erfolgte eine Photonenbestrahlung mit 6 Gy oder die Zellen wurden keiner Radiatio unterzogen. Nach 14 Tagen wurden Medium und Zellüberstände abgeschüttet, die Kolonien gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt. Die Kolonien wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Dargestellt ist das klonogene Überleben in % in Bezug auf die unbestrahlte Kontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test überprüft. Nach Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich eine signifikante Zunahme des klonogenen Überlebens unter 0,1 und 10 µg/ml LPS.



#### 4.3.4 Mittels Zellzählung ist nach 24 h keine Steigerung des Zellüberlebens nach Radiatio messbar

Auch an der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H226 wurde das Proliferationsverhalten nach Bestrahlung mit 6 Gy unter LPS-Inkubation mittels Zellzählung untersucht. Zur Ergebnisdarstellung wurde das prozentuale Überleben der bestrahlten Zellen im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrollgruppe nach 24 und 48 Stunden angegeben. Abbildung 4.17 stellt das Proliferationsverhalten der Zelllinie H226 nach Bestrahlung mit 6 Gy unter Endotoxin-Inkubation zum Zeitpunkt nach 24 Stunden dar. Auffallend war hier, dass LPS kaum zu einem Anstieg der Zellproliferation geführt hat. Das prozentuale Zellüberleben der nicht mit Endotoxin inkubierten Kontrollgruppe liegt nach Bestrahlung mit 6 Gy nach 24 Stunden etwa 10% unter dem der Vergleichsgruppe der A549-Zellen. Auffallend ist, dass bei der Zelllinie H226 eine längere Inkubation über 48 Stunden nach Bestrahlung insgesamt zu keinem weiteren Abfall des prozentualen Zellüberlebens führte, weshalb hier ebenfalls auf eine grafische Darstellung der Ergebnisse verzichtet wurde.



**Abbildung 4.17:**  
Proliferationsverhalten der mit 6 Gy bestrahlten Zelllinie H226, ausgewertet anhand Zellzählung nach 24 h.

15000 Zellen wurden je well auf einer 24-well Platte in 500 µl Nährmedium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Eine Stunde vor Radiatio bzw. Nicht-Radiatio erfolgte die Stimulation mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. Die Zellen wurden nach erfolgter bzw. nicht erfolgter Bestrahlung für weitere 24 Stunden inkubiert. Schließlich wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und anschließend trypsiniert und diese Reaktion mit einer aus FCS hergestellten Stop-Solution beendet. Anschließend wurde die Zellzahl mittels automatisierter Zellzählung ermittelt.

Dargestellt ist das prozentuale Überleben der Zellen nach Stimulation mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen in Bezug auf die nicht stimulierten Kontroll-Zellen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test überprüft, wobei sich die Ergebnisse als nicht signifikant zeigten.

Erkennbar ist lediglich ein minimaler Anstieg des prozentualen Überlebens um 3% unter 10 µg/ml LPS.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, in wie weit Endotoxin von *E.coli* die Ansprache auf Bestrahlung in NSCLC-Zelllinien beeinflusst. Besonderer Stellenwert wurde dabei auf die Untersuchung der Auswirkung von LPS auf Radiatio anhand von Koloniebildungstests gelegt, da diese den Goldstandard zur Beurteilung der Effektivität der Strahlenwirkung darstellen. Zudem stellt der Verlust des klonogenen Überlebens einen der wichtigsten Mechanismen der Strahlentherapie dar, da klonogene Tochterzellen als wesentlicher Faktor zur Metastasierung und Rezidivierung von Tumoren angesehen werden können.

### 5.1 Die unterschiedliche Strahlensensibilität der einzelnen Zelllinien

Die in den Experimenten verwendeten Zelllinien erwiesen sich als unterschiedlich strahlensensibel, wobei die Zelllinie H23 in den Koloniebildungstests die geringste Plattierungseffizienz nach Bestrahlung und damit die höchste Strahlensensibilität aufwies. Die makroskopisch zu beurteilenden Kolonien stellten sich als aus nur wenig zusammenhängenden Tochterzellen dar, zudem konnten auffällig viele ballonierte Einzelzellen beobachtet werden. Die Zelllinien A549 und H226 erwiesen sich in allen Versuchen als wesentlich strahlenresistenter. Nach Bestrahlung mit 2 Gy überlebten 68% der A549 Zellen und 46,8% der H226 Zellen, wohingegen nur 37% der H23 Zellen überlebten. Nach Radiatio mit 6 Gy zeigte sich bei den H23 Zellen nur ein Überleben von 1,9%, während sich bei A549 Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy ein Überleben von 11% zeigte. An den H226 Zellen konnte hiernach ein klonogenes Überleben von 5% gemessen werden.

Begründet ist die individuelle Strahlensensibilität der Zelllinien in einer großen Anzahl an unterschiedlichen DNA-Schäden, wobei DNA-Doppelstrangbrüche die zur Wirkung der Radiatio wichtigsten und kritischsten Ereignisse darstellen (Iliakis 1991; Foray et al. 1998). Die in Tumorzelllinien bestehenden Variationen in der Induktion von Doppelstrangbrüchen der DNA kann als der verantwortliche Hauptfaktor angesehen werden, dass Tumorzelllinien unterschiedlich strahlenempfindlich sind (Roos et al. 2000; Ruiz de Almodovar, J M et al. 1994). Die Anzahl der nach Bestrahlung verbleibenden Doppelstrangbrüche korreliert dabei mit der zellulären Strahlensensibilität (Kiltie et al. 1997)

Ferner kann die unterschiedliche Ansprache der Zelllinien auf Bestrahlung mit einem genetischen Ansatz erklärt werden:

Williams et. al postulieren, dass das stärkste Korrelat der Radiosensitivität menschlicher Tumorzellen auf dem Expressionsstatus spezifischer Gene basiert (Williams et al. 2008). Insbesondere Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 wird ein möglicher Einfluss auf die Therapieansprache nach Bestrahlung zugesagt (Bristow et al. 1996; Raju et al. 2015). Verschiedene Arbeiten konnten eine Assoziation zwischen zellulärer Radiosensitivität und p53-Spiegeln zeigen, wobei Zellen die den Wildtyp Wtp53 exprimierten, gegenüber Bestrahlung sensibler waren als Zellen, die ein mutiertes Suppressorgen p53 exprimierten (Weber und Wenz 2002). Es wurde gezeigt, dass die Zelllinien H23 und H226 ein mutiertes Suppressorgen p53 exprimieren (Takahashi et al. 1989) während A549 den Wildtyp Wtp53 besitzt (Leroy et al. 2014). Aus den eben beschriebenen Aussagen folgt, dass die Zelllinie H23 und auch die Zelllinie H226 gegenüber Bestrahlung resistenter sein müsste, was sich jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigen ließ. Eventuell weisen die H23-Zellen nach Radiatio eine höhere Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen auf, was wiederum im Einklang mit unseren Befunden stehen würde. Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Strahlensensibilität könnte im KRAS-Status der Zelllinien liegen (Wang et al. 2017). Neuere Untersuchungen an NSCLC Zelllinien zeigen, dass neben der Mutation im p53-Gen auch die Expression eines mutierten KRAS-Gens mit einer erhöhten Radioresistenz einhergeht (Wang et al. 2017). A549 Zellen weisen eine KRAS-Mutation auf, wohingegen H23 und auch H226 den Wildtyp exprimieren. Dies würde eine Erklärung für die relative „Robustheit“ der A549-Zellen gegenüber Strahlentherapie und der Empfindlichkeit der H23-Zellen liefern.

## **5.2 Die unterschiedlichen Methoden zur Beurteilung der Strahlensensitivität**

Wie bereits beschrieben wurden die Ergebnisse dieser Arbeit anhand des MTS-Assays, der Zellzählung und mittels Koloniebildungstest gewonnen und ausgewertet.

Der MTS Assay wurde bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben.

Nach Bestrahlung mit 6 Gy stellte sich nach 24h die MTS-Aktivität als völlig unverändert gegenüber der unbestrahlten Kontrollgruppe dar.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die nach Bestrahlung weiterhin aktiven Stoffwechselprozesse in den Zellen sein. Wie kürzlich in der Studie von Liao und Kollegen gezeigt, können nach dem durch Radiatio verursachten irreversiblen Wachstums-Stopp an Zellen metabolische Prozesse zunächst weiterhin aktiv sein und durch Bestrahlung sogar induziert werden (Liao et al. 2014). Im Einklang zu dieser Studie liegt insbesondere bei den A549 Zellen das Überleben nach 24 h nach Bestrahlung bei > 100%. Somit ist der MTS Assay, welcher auf Messungen der metabolischen Aktivität beruht, zur adäquaten Quantifizierung der Bestrahlungseffekte auf die Zellen unter den

aktuellen experimentellen Bedingungen nicht geeignet, weshalb diese Methode nicht weiterverfolgt wurde. In einer erst kürzlich von Rai et al. 2018 veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass Bestrahlung mitochondriale Stoffwechselprozesse deutlich verstärken kann und somit mit einer vermehrten mitochondrialen Aktivität einhergeht (Rai et al. 2018). Da die Wirkung des MTS Assays auf der mitochondrialen Dehydrogenase beruht, bedeutet dies konkret, dass Bestrahlung in einer vermehrten Aktivität des Enzyms resultieren könnte und somit zu dem indirekt erhöhten Zellüberleben beiträgt.

Weiterhin wurde nach Bestrahlung mit 6 Gy die tatsächlich überlebende Zellzahl mittels Zellzählung quantifiziert. Tatsächlich zeigte sich 24 Stunden nach Bestrahlung mit 6Gy ein Abfall der überlebenden Zellen auf etwa 64% an A549 Zellen, 55% an H226 Zellen und 40% an H23 Zellen, die sich demnach auch in dieser Methode als am strahlensensibelsten darstellen. Prinzipiell könnte somit die direkte Zellzählung als geeignet angesehen werden, um den Bestrahlungseffekt darzustellen. Verglichen mit dem Überleben der Zellen im Koloniebildungstest, wobei sich nach einer Bestrahlung mit 6 Gy ein Überleben auf 11% an A549 Zellen, 5% an H226 Zellen und lediglich von 2% an H23 Zellen zeigte, lässt sich zunächst im Vergleich der Zelllinien untereinander eine Korrelation zwischen Zellzählung und Koloniebildungstest hinsichtlich der Strahlensensibilität zeigen, da in beiden Testverfahren die Zelllinie A549 am strahlenresistentesten und die Zelllinie H23 am sensibelsten war. Allerdings ist das Überleben der Zellen bei der direkten Zellzählung deutlich höher. Dies ist sicher in der unterschiedlichen Methodik begründet:

In der Zellzählung wird die nach Bestrahlung vorhandene tatsächliche Zellzahl bestimmt. Durch die Bestrahlung werden die Zellen in das Stadium der zellulären Seneszenz überführt (Sabin und Anderson 2011). Die seneszenten Zellen, welche nicht zur Proliferation in der Lage sind und ihre Klonogenität verloren haben, werden durch die Zellzählung mitefassen. Dies könnte bei Quantifizierung der Ergebnisse durch Zellzählung zur Überschätzung des Zellüberlebens führen, was exakt den oben dargestellten Daten entspricht. Zudem wurde die Zellzählung 24h und 48h nach der Bestrahlung durchgeführt, während der Koloniebildungstest erst 7- 10 Tage nach der erfolgten Radiatio ausgewertet wird, was eine weitere Ursache für die quantitativen Unterschiede hinsichtlich des zellulären Überlebens darstellen könnte.

Der Koloniebildungstest und die Darstellung der Ergebnisse in Form einer Überlebenskurve nach Puck und Marcus stellt den Goldstandard der Quantifizierung des zellulären Überlebens in Bestrahlungsexperimenten dar. Bei diesem Assay wird der

Fokus auf den durch Bestrahlung induzierten Verlust der Klonogenität von Zellen gelegt (Herrmann et al. 2006). Aufgrund der bestmöglichen Quantifizierbarkeit und der guten Validität wurde in dieser Arbeit schließlich der Fokus auf den Koloniebildungstest gelegt. Der Koloniebildungstest ist auch deswegen von besonderer klinischer Relevanz, da Malaise et al. die Hypothese aufstellten, dass die Klonogenität in vitro mit der Stammzelleigenschaft in vivo korreliert (Malaise et al. 1986).

### **5.3 Die Wirkung von Endotoxin auf das klonogene Überleben an unbestrahlten Zellen**

Chronische Entzündungsprozesse stellen einen wesentlichen Einflussfaktor zur Krebsentstehung und Aufrechterhaltung des Tumormikromilieus dar. Beispielhaft kann hier die Entstehung von Magenkarzinomen durch *Helicobacter pylori*, das Auftreten von Blasenkrebs nach Infektion mit Schistosomen und die Karzinogenese hepatozellulärer Tumoren bei chronischer Hepatitis B und C Infektion angesehen werden (Mantovani et al. 2008; Balkwill et al. 2005). Auch akute Entzündungsprozesse, die experimentell durch exogene Verabreichung von TNF $\alpha$ , IL-1 und LPS getriggert wurden, können unter bestimmten Umständen Malignität und Metastasierung hervorrufen (Balkwill und Mantovani 2001).

In dieser Arbeit wurden zwei Adenokarzinom-Zelllinien, A549 und H23, sowie eine Plattenepithelkarzinom-Zelllinie, H226, mit drei unterschiedlichen Dosen LPS inkubiert und dadurch eine Entzündungsreaktion in vitro simuliert.

Anhand der Auswertung der Koloniebildungstests konnte in dieser Arbeit keine Steigerung des Überlebens unbestrahlter A549-, H23- und H226-Zellen unter Endotoxin gezeigt werden. Dies deckt sich mit den kürzlich publizierten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, wobei ebenfalls keine Zunahme des klonogenen Überlebens an den NSCLC-Zelllinien A549, H1975 und H520 unter LPS-Stimulation gemessen werden konnte (Gökyildirim et al. 2018).

### **5.4 Auswirkungen von LPS auf die Bestrahlung der NSCLC-Zelllinien**

#### **5.4.1 Bekannte radioprotektive Effekte von Endotoxin und zugrundeliegende Mechanismen**

Da das wesentliche Ziel dieser Arbeit darin bestand, zu untersuchen, inwieweit sich die Ansprache auf Strahlentherapie in NSCLC-Zelllinien durch LPS beeinflussen lässt, wurde mittels Zellzählung, MTS-Assay und Koloniebildungstest bezüglich jeder LPS-Dosis die Surviving Fraction ermittelt und beurteilt.

In einer Vielzahl von Studien wird Endotoxin als eine Substanz beschrieben, die Zellen vor dem schädigenden Einfluss von Strahlung schützt. Neta et al. konnten in ihren Versuchen demonstrieren, dass sowohl durch LPS induziertes IL-1 als auch TNF $\alpha$  zur Radioprotektion beitragen. Durch Zugabe von Anti-IL-1 Rezeptor Antikörpern oder Anti-TNF wurde in Tierversuchen das Überleben von bestrahlten Mäusen signifikant reduziert (Neta et al. 1991). Daraus folgerten Neta et al., dass natürliche Spiegel an IL-1 und TNF zu einer gewissen Strahlenresistenz der Mäuse führen und LPS über diese Mediatoren zum Schutz vor Bestrahlung beitragen kann.

Auch in neueren Versuchen wurde gezeigt, dass Endotoxin strahlenprotektiv im Dünndarm von Mäusen wirkt. Eine strahleninduzierte Apoptose von Dünndarmepithelzellen wurde hier durch Vorbehandlung mit LPS reduziert. Als radioprotektiver Mechanismus konnte die durch TNF $\alpha$  stimulierte, COX-2-abhängige Bildung von PGE2 detektiert werden (Riehl et al. 2004). Ferner wurde in weiteren Studien Prostaglandinen eine direkt radioprotektive Funktion zugeschrieben (Walden, T L Jr und Farzaneh 1995; Hanson und Ainsworth 1985).

Wie bereits erwähnt, entfaltet LPS seine Wirkung über Ligation des TLR-4. Liu et al. führten Untersuchungen mit TLR-4-defizienten Mäusen durch und fanden heraus, dass diese gegenüber strahleninduzierter Mortalität und Morbidität wesentlich anfälliger waren als Mäuse, die TLR-4 exprimieren konnten. TLR-4-negative Mäuse wiesen in Versuchen größere strahleninduzierte Schäden an Knochenmark, Darm, Niere, Milz, Hoden und Lunge auf und es konnte eine höhere strahleninduzierte dosisabhängige Apoptoserate beobachtet werden (Liu et al. 2013). Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Injektion von LPS zu Strahlenresistenz führt und insbesondere 24 Stunden vor Bestrahlung stark radioprotektive Effekte aufweist, wobei MyD88 als Adaptermolekül in der basalen Strahlenresistenz identifiziert wurde (Liu et al. 2013).

In verwandten Studien konnten diese Effekte nicht nur für TLR-4 nachgewiesen werden, sondern wurden auch für TLR-5-Agonisten in Maus- und Affenmodellen nachgewiesen (Burdelya et al. 2008).

Eine Toll-like-Rezeptor-Aktivierung mündet letztendlich über eine komplexe Signalkaskade unter anderem in einer vermehrten Aktivierung von NF $\kappa$ B (siehe Abb. 1.4). Auch eine in den meisten Tumoren erhöhte basale NF $\kappa$ B-Aktivität wird mit einer Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie in Verbindung gebracht (Orlowski und Baldwin 2002). Dabei beeinflusst NF $\kappa$ B die Sensitivität gegenüber Strahlen- und Chemotherapie zelltypabhängig und insbesondere Radiatio aktiviert die Bindung von NF $\kappa$ B an die DNA und somit die Induktion verschiedener, höchst wahrscheinlich die Therapieansprache beeinflussende Gene (Brach et al. 1991). In anderen Versuchen

konnte durch Blockierung von NF $\kappa$ B ein Anstieg der Apoptoserate bewirkt werden sowie ein Abfall von Wachstum und eine Reduktion des klonogenen Überlebens einiger humaner Tumorzelllinien (Chen et al. 2002; Herscher et al. 1999). Auf molekularer Ebene konnte die antiapoptotische Wirkung von NF $\kappa$ B mit der Induktion des TNF $\alpha$ -Signalweges und der Wirkung über TNFR1 in Verbindung gebracht werden (Ahmed und Li 2008).

Eine mögliche weitere wichtige Rolle einer mangelnden Ansprache auf Bestrahlung spielt EGFR, eine Rezeptortyrosinkinase, die durch EGF aktiviert wird und zu Zellwachstum, -differenzierung und -proliferation beiträgt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass LPS für die Aktivierung von EGFR verantwortlich ist (Hattar et al. 2013; De et al. 2015). Strahlung ist jedoch auch direkt in der Lage EGFR zu transaktivieren (Todd et al. 1999), wobei dieser molekulare Prozess als essenziell für das Zellüberleben angesehen werden kann (Toulany et al. 2005; Toulany et al. 2006). Dittmann et al. konnten beweisen, dass EGFR eine enorme Stellung in der Reparatur von durch Radiatio induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen einnimmt (Dittmann et al. 2005).

#### **5.4.2 Auswirkungen von LPS auf die Bestrahlung der Zelllinie A549**

Anhand des Koloniebildungstests konnte in dieser Arbeit unter Inkubation mit LPS die Induktion einer Strahlenresistenz gezeigt werden. Dies könnte im Wesentlichen darauf zurückzuführen sein, dass LPS durch die Induktion von COX-2 (Riehl et al. 2004; Hattar et al. 2013) und NF $\kappa$ B (Lu et al. 2008; Brach et al. 1991) sowie durch die Aktivierung von EGFR (Hattar et al. 2013; Dittmann et al. 2005, De et al. 2015) über verschiedene molekulare Mechanismen radioprotektiv wirkt.

Das klonogene Überleben der mit 2 Gy bestrahlten Zellen zeigte ein signifikantes Maximum unter Inkubation mit 10  $\mu$ g/ml LPS. Hier kam es zu einer Steigerung des klonogenen Überlebens von etwa 68% auf 80%. Nach Bestrahlung mit 6 Gy wurde ebenfalls eine Zunahme der Strahlenresistenz beobachtet. Ein signifikanter Anstieg des klonogenen Überlebens war unter LPS-Inkubation mit einer Konzentration von 1 sowie 10  $\mu$ g/ml erkennbar. Hier war eine Steigerung der Überlebensfraktion von 10,8% auf 15% erkennbar, was nahezu einem Anstieg um 50% entspricht.

Nach Auswertung der Bestrahlungsexperimente mittels Zellzählung war 24 Stunden nach Radiatio mit 6 Gy die deutlichste Proliferationssteigerung ebenfalls unter LPS-Inkubation mit Konzentrationen von 10  $\mu$ g/ml darstellbar ( $p=0,002$ ), das Überleben stieg von 64% auf etwa 83% in der bestrahlten Gruppe in Anwesenheit von LPS.

Mittels Zellzählung konnte beobachtet werden, dass die Steigerung der Zellproliferation nach 24 Stunden insbesondere unter Inkubation mit 10  $\mu$ g/ml LPS deutlicher als nach

48 Stunden ausfiel. Erklärbar könnte dies durch ein eventuelles Wirkungsmaximum von LPS auf die direkte Zellproliferation nach 24 Stunden und einer zu späteren Zeitpunkten nachlassenden Wirkung sein. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hattar et al., die in ihrer Arbeit ebenfalls anhand Zellzählung demonstrieren konnten, dass unter LPS-Einfluss ein Proliferationsmaximum der Zellen bei 24 Stunden auftritt (Hattar et al. 2013). Es ist denkbar, dass das Wirkmaximum von LPS nach 24 Stunden durch die molekularen Wirkungen und unter anderem durch die Stimulation von TNF $\alpha$  verursacht sein kann: Balkwill und Kollegen konnten zeigen, dass TNF $\alpha$  in hohen Dosen eine Antitumor-Immunität verursachen kann (Balkwill 2002; Balkwill et al. 2005). In Untersuchungen in vivo an Hühnern und Pferden konnte gezeigt werden, dass die durch Endotoxin stimulierte Ausschüttung von Interleukinen zu frühen Zeitpunkten induziert wird und bereits nach 48 h wieder rückläufig ist (Xie et al. 2000; Tadros und Frank 2012). Möglich wäre, dass sich ebenso in vitro die durch LPS bedingten Effekte zu frühen Zeitpunkten ereignen und daher zu früheren Zeitpunkten besser quantifizierbar sind.

#### **5.4.3 Auswirkungen von LPS auf die Bestrahlung der Zelllinie H23**

In den durchgeführten Experimenten erwies sich H23 als die strahlensensibelste Zelllinie, was sich insbesondere nach Bestrahlung mit 6 Gy als nur geringes klonogenes Überleben darstellte. Als verantwortlicher Faktor hierfür kann wie oben beschrieben eine Variation in der Induktion von Doppelstrangbrüchen angesehen werden (Roos et al. 2000; Ruiz de Almodovar, J M et al. 1994) sowie das Vorhandensein eines KRAS Wildtyps sein.

Im Koloniebildungstest konnte nach Bestrahlung mit 2 Gy eine Steigerung des klonogenen Überlebens von 37% auf 42% unter Inkubation mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS gezeigt werden, was sich allerdings als statistisch nicht signifikant erwies. Höhere LPS-Konzentrationen erzielten ebenfalls keinen weiteren signifikanten Anstieg des klonogenen Überlebens. Dies könnte in der bereits erwähnten enormen Strahlensensibilität der H23-Zellen begründet sein, sodass sich ein möglicher kumulativ toxischer Effekt von höheren LPS-Konzentrationen in Kombination mit Bestrahlung stärker manifestierte. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedliche Sensibilität der Zellen gegenüber Endotoxin-Exposition könnte in der unterschiedlichen Verteilung von Toll-like Rezeptoren auf deren Zelloberfläche liegen: Besonders TLR-4 ist in vielen Tumorzelllinien überexprimiert. Wang et al. konnten zeigen, dass Zellen mit einer geringeren TLR-4 Expression eine höhere Zytotoxizität gegenüber LPS aufwiesen. Dies ist gleichbedeutend damit, dass eine erhöhte Anzahl von TLR-4 Rezeptoren Zellen vor LPS-induzierter Zytotoxizität schützt und somit Zellüberleben und –proliferation



fördert (Wang et al. 2013). Im Einklang mit dieser Hypothese zeigen unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe, dass H23-Zellen eine auf mRNA-Ebene geringere TLR-4 Expression aufweisen als A549 und H226 Zellen, womit die vergleichsweise hohen Zytotoxizität von LPS zusammen mit Bestrahlung erklärt sein könnte.

Nach Bestrahlung mit 6 Gy lag das klonogene Überleben der Kontrollzellen nach Inkubation über etwa 10 Tage nur bei etwa 2%. Aufgrund des geringen Überlebens ließen sich nach Bestrahlung mit 6 Gy nur tendenzielle Zunahmen der Strahlenresistenz beobachten. Schon allein methodisch bedingt können die geringen Koloniezahlen zu einer höheren Fehleranfälligkeit bei der manuellen Auswertung führen. Aus diesen Gründen lassen sich die Ergebnisse an H23 Zellen mit den Ergebnissen der Zelllinie A549 nach Radiatio mit 6 Gy kaum vergleichen. Hier zeigte sich das klonogene Überleben in der Kontrollgruppe wenigstens bei 11%.

Anhand der Zellzählung der H23-Zellen konnte 24 h nach Bestrahlung mit 6 Gy eine signifikante Zunahme der Zellproliferation unter Inkubation mit 0,1 µg/ml LPS gezeigt werden. Hierbei zeigte sich eine Zunahme des Überlebens von 40% auf 45%. Nach Inkubation mit 10 µg/ml LPS konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Zunahme der Radioresistenz und somit des Zellüberlebens gemessen werden, was darauf hindeutet, dass in dieser Zelllinie ebenfalls ein radioprotektiver Effekt von LPS vorhanden ist, der jedoch aus den o.g. Gründen im Koloniebildungstest nicht erfasst wird.

#### **5.4.4 Wirkung von LPS auf die Bestrahlung der Zelllinie H226**

Anhand der Koloniebildungstests der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H226 konnte nach Inkubation mit LPS sowohl nach Bestrahlung mit 2, als auch mit 6 Gy eine Veränderung bezüglich des klonogenen Überlebens gezeigt werden. Hierbei zeigte sich ein signifikantes Maximum des klonogenen Überlebens unter Inkubation mit 0,1 µg/ml LPS nach Bestrahlung mit 2 Gy. Es war eine deutliche Steigerung des Überlebens von 46% auf 61% nach Radiatio mit 2 Gy erkennbar. Bei Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg des klonogenen Überlebens bei einer LPS-Dosis von 0,1 µg/ml. Die Verdopplungszeit der H226 Zellen liegt mit 61 Tagen höher als die der H23 und A549 Zellen, sodass die Versuche daher über 14 Tage anstatt über 10 Tage durchgeführt wurden. Eine mögliche Erklärung für die geringere Effektivität höherer LPS-Konzentrationen hinsichtlich der Induktion der Strahlenresistenz könnte die aufgrund der längeren Inkubationsdauer stärkere Zytotoxizität unter höheren LPS-Dosen sein. Balkwill und Kollegen konnten zeigen, dass die LPS-abhängige Induktion von TNFα auch antiproliferativ wirken kann (Balkwill 2002). Insbesondere aufgrund der längeren Inkubationsdauer wäre dies hier ein möglicher Erklärungsansatz.

Die unterschiedlich ausfallende Reaktivität der Plattenepithelkarzinomzelllinie im Vergleich zu den Adenokarzinomzelllinien könnte ebenso durch eine unterschiedliche Ansprache der Zellen auf LPS aufgrund der unterschiedlichen Verteilung von TLR-4 zurückzuführen sein.

Die in unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe sich darstellende vergleichsweise hohe TLR4-Expression der H226-Zellen könnte die unterschiedliche Ligand-Rezeptor-Kinetik begründen.

Im Unterschied zu den Zelllinien A549 und H23 zeigte sich in der Zellzählung kein radioprotektiver Effekt von LPS sowohl nach 24- als auch nach 48-stündiger Inkubationszeit. Das Ausbleiben eines Effektes im Vergleich zu den anderen Zelllinien könnte am ehesten in der deutlich verlängerten Verdopplungszeit der H226-Zellen begründet sein; um dies zu klären, wären längere Inkubationszeiten nötig gewesen.

### **5.5. Neue molekulare Mechanismen der LPS-induzierten Strahlentherapieresistenz in NSCLC-Zellen**

Die neuesten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass LPS in Kombination mit Bestrahlung in den TLR-4 exprimierenden Zelllinien A549 und H1975 dosisabhängig eine Zunahme des klonogenen Überlebens und somit der Strahlenresistenz verursacht. Ein mittlerweile in unserer Arbeitsgruppe identifizierter molekularer Mechanismus der Endotoxin-induzierten Strahlentherapieresistenz beruht auf der Phosphorylierung von cAMP response element-binding protein (CREB), einem Transkriptionsfaktor, welcher eine Schlüsselrolle in Zellwachstum und -Überleben, Proliferation, Differenzierung und Apoptose spielt (Gökyildirim et al. 2018). Durch Hemmung dieser Signalkaskade kann die Strahlensensibilität in LPS-behandelten NSCLC-Zellen wieder erhöht werden. Interessanterweise scheint die Aktivierung von CREB einen positiven Effekt auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) zu haben (D'Auria et al. 2017), da unter anderem eine down-Regulation von CREB in CHO-Zellen mit einer verminderten DNA-Reparaturkapazität und konsekutiv gesteigerten Radiosensitivität einhergeht (Amorino et al. 2003).

Ein weiterer möglicher molekularer Faktor, der die LPS-induzierte Strahlentherapieresistenz vermittelt, könnte die Aktivierung des ERK-abhängigen Signalweges darstellen, da ERK in bestrahlten Zellen, die gleichzeitig mit LPS behandelt wurden, vermehrt phosphoryliert wird und eine ERK-Inhibition die Radiosensitivität in LPS-behandelten Zellen wiederherstellte (Hattar et al., nicht publizierte Daten). Eine Rolle von ERK bei der Induktion einer Radiotherapieresistenz ist insbesondere an Kopf-Hals-Tumoren gut belegt (Affolter et al. 2011) und könnte auch im NSCLC eine Rolle spielen.

Darüber hinaus konnten wir in unserer Arbeitsgruppe mittels RT-PCR nachweisen, dass durch LPS-Stimulation dosisabhängig verschiedene Multi-Drug-Resistance-Gene an A549 Zellen hochreguliert werden, die einen großen Stellenwert in der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika besitzen. In einer 2012 von Wei et al. veröffentlichten Arbeit wurden MDR- und RDR- assoziierte Proteine in A549 und in Cisplatin-resistenten A549/DDP-Zellen untersucht. Die Cisplatin-resistenten Zellen zeigten nach Bestrahlung mit 2, 4, 6, 8 und 10 Gy ein höheres Überleben als die nicht resistenten Zellen. Zudem war die durch Radiatio verursachte Apoptoserate in den A549 Zellen signifikant höher als in den MDR-Zellen. Anhand verschiedener Methoden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Strahlenresistenz-assoziierte Proteine in den Cisplatin-resistenten Zellen vermehrt exprimiert wurden (Wei et al. 2012). Dieser Mechanismus könnte ebenfalls der LPS-vermittelten geringeren Radiosensitivität von NSCLC-Zellen mit zugrunde liegen und bedarf weiterer Abklärung.

Insgesamt bedarf die exakte Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die bei der Endotoxin-induzierten Strahlentherapieresistenz involviert sind, weiterer Klärung. Die hier vorgelegten Ergebnisse, die einerseits Aufschluss über geeignete Methoden zur Quantifizierung der Strahlentherapieeffizienz geben, die Strahlensensibilität einzelner Zelllinien beschreiben und erste radioprotektive Effekte von Endotoxin an den verwendeten NSCLC-Zelllinien herausarbeiten konnten, bilden die Grundlage für diese weiterführenden Untersuchungen.

#### **5.4.5 Klinischer Ausblick**

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Endotoxin eine wesentliche Rolle in der Induktion einer Therapieresistenz gegenüber Bestrahlung einnimmt.

Wie oben beschrieben, führt neben der COX-2-vermittelten Induktion von Prostaglandinen (Riehl et al. 2004) sowohl die durch Radiatio vermittelte Bindung von NF $\kappa$ B an die DNA (Brach et al. 1991) als auch die Aktivierung von EGFR (Dittmann et al. 2005) zu einer Verminderung der Apoptoserate und einer Erhöhung des Zellüberlebens. Verdeutlicht wird hierdurch zweifelsohne noch einmal der große Stellenwert gramnegativer Infekte, die häufig mit Lungenkarzinomen vergesellschaftet sind oder im Laufe der Erkrankung auftreten und die Überlebenszeit der Patienten deutlich vermindern können (Perlin et al. 1990; Putinati et al. 1994). Neben einer adäquaten antibiotischen Abdeckung gibt es neuere, weitere therapeutische Angriffspunkte, die einer Endotoxin-bedingten Therapieresistenz entgegenwirken.

Neuere Studien konnten zeigen, dass der selektive COX-2 Inhibitor Celecoxib in der Lage ist, Zellproliferation zu inhibieren und in einer Vielzahl von Tumorzellen Apoptose auszulösen (Milas et al. 2003; Niederberger et al. 2004). In Experimenten konnte demonstriert werden, dass COX-2 Inhibitoren Signaltransduktionswege beeinflussen, die in Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose involviert sind (Guo und Sonenshein 2004; Gasparini et al. 2003). Dittman et al. konnten zeigen, dass eine Celecoxib-Vorbehandlung mit klinisch relevanten Dosen zu einer deutlichen Sensitivierung gegenüber Bestrahlung in A549-Zellen führt (Dittmann et al. 2008).

Einen weiteren möglichen therapeutischen Angriffspunkt stellt der unter anderem für Zellproliferation und –differenzierung verantwortliche EGF-Rezeptor dar, der bei Lungenkarzinomen, Kolonkarzinomen, Glioblastomen und einer Vielzahl anderer Tumorerkrankungen mutiert sein kann und im Sinne einer „targeted therapy“ neuere Therapiemöglichkeiten darstellt. Darüber hinaus sind gramnegative Pathogenitätsfaktoren wie LPS in der Lage, EGFR zu aktivieren (Hattar et al. 2013; De et al 2015). Bedacht werden muss auch, dass Strahlung an sich EGFR transaktivieren kann und damit indirekt zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beiträgt (Todd et al. 1999; Dittmann et al. 2005). Neuere EGFR-Inhibitoren wie Gefitinib und Erlotinib setzen direkt an der Rezeptor-Tyrosinkinase an und konnten in 60% der Fälle gute Ansprechraten zeigen (Jackman et al. 2009). Neuere Studien konnten synergistische Effekte von Radiatio und den Einsatz von EGFR-Inhibitoren zeigen, die eine Verlängerung des medianen Überlebens zeigten (Provencio und Sánchez 2014; Zheng et al. 2013).

Weitere Therapiemöglichkeiten könnten in der Blockierung von NF $\kappa$ B (Lee et al. 2007; Tilborgh et al. 2017) oder von TLR4 direkt liegen, welche jedoch Gegenstand der aktuellen Forschung sind. Ferner liegt ein anderer möglicher Ansatz neuer Therapiestrategien in der Inhibition von CREB: In NSCLC-Zellen führt LPS zu einem CREB-abhängigen Anstieg der Strahlenresistenz. In unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen zu zeigen, dass diese Zunahme der Strahlenresistenz durch spezifische Inhibition von CREB reversibel ist und daher neue therapeutische Möglichkeiten bieten kann (Gökyildirim et al. 2018).

## 6 Zusammenfassung

Pneumonien sind häufige Komplikationen bei Patienten mit NSCLC. Hierbei findet man meist gram-negative Erreger, deren Virulenz in erster Linie durch die Zellwandkomponenten, besonders durch gram-negatives Lipopolysaccharid (LPS), definiert wird. Das Auftreten von Pneumonien bedingt eine schlechtere Prognose und Therapieansprache im NSCLC. Die Strahlentherapie stellt einen integralen Bestandteil in der Therapie des NSCLC dar. Daher wurde in dieser Dissertation untersucht, inwieweit LPS die Ansprache auf eine Strahlentherapie verändert.

Drei humane NSCLC Zelllinien, A549 (Adenokarzinom), H23 (Adenokarzinom) und H226 (Plattenepithelkarzinom) wurden mit steigenden Konzentrationen von LPS inkubiert und das zelluläre Überleben mittels drei unterschiedlicher Methoden untersucht. Anhand des klonogenen Überlebens (Koloniebildungstest) und direkter Zellzählung wurde das Überleben nativer und mit einer Strahlendosis von 2 und 6 Gy behandelte Zellen direkt quantifiziert. Indirekt wurde das zelluläre Überleben anhand des MTS-Assays untersucht, welches die Stoffwechselaktivität der Zellen misst. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde die Überlebensfraktion berechnet, welche das prozentuale Verhältnis von bestrahlten zu unbestrahlten Zellen ausdrückt.

Der Vergleich der unbehandelten Zelllinien hinsichtlich ihres Verhaltens nach Radiatio im Koloniebildungstest erbrachte, dass die Adenokarzinomzelllinie A549 die strahlenresistenteste war, während die Adenokarzinomzelllinie H23 die höchste Strahlensensitivität aufwies. Die Plattenepithelkarzinomlinie H226 zeigte diesbezüglich ein intermediäres Verhalten.

Verglichen mit dem Goldstandard, dem Koloniebildungstest, erwies sich die direkte Zellzählung ebenfalls als geeignet, um eine Strahlensensitivität darzustellen und lieferte vergleichbare Ergebnisse mit einer tendenziell höheren Überlebensfraktion, was vermutlich methodisch bedingt ist. Da sich die Stoffwechselaktivität nach Radiatio nicht änderte, war der MTS-Assay nicht geeignet um im aktuellen experimentellen Aufbau die Strahlensensitivität der einzelnen Zelllinien zu untersuchen.

Eine alleinige Stimulation aller drei unbestrahlten Zelllinien mit Endotoxin (0,1, 1 und 10 µg/ml) induzierte keinen messbaren Anstieg des klonogenen Überlebens.

Im Koloniebildungstest zeigte sich bei der Adenokarzinomzelllinie A549 sowohl im Niedrigdosisbereich von 2 Gy als auch unter Bestrahlung mit 6 Gy 10 µg/ml Endotoxin als effizienteste Dosis zur Induktion einer Strahlenresistenz. An der Zelllinie H23 konnte selbiges Ergebnis aufgezeigt werden, an der Zelllinie H226 trat eine statistisch signifikante Hemmung der Strahlensensibilität jedoch unter einer Konzentration von 0,1 µg/ml LPS auf.

Bis auf die hoch strahlensensible Zelllinie H23, die nach Bestrahlung mit 6 Gy lediglich ein Überleben von etwa 2-3% der Zellen aufwies, konnte stets im Niedrigdosis- (2Gy) als auch im Hochdosisbereich (6Gy) eine Strahlenresistenz durch LPS induziert werden. Die direkte Zellzählung erbrachte vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Ausprägung der LPS-induzierten Strahlenresistenz an den Zelllinien A549 und H23, nicht jedoch an der Zelllinie H226. Allerdings war das Niveau der detektierten Strahlensensibilität bei dieser Methode geringer.

Zusammenfassend induzierte die LPS-Behandlung an nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen eine Abnahme der Strahlentherapieansprache. So könnten bakterielle Infekte eine Therapieresistenz im Lungenkarzinom begünstigen. Mögliche zugrundeliegende Mechanismen könnten beispielsweise in der Stimulation der Cyclooxygenase und Freisetzung von Prostanoiden, der Aktivierung des EGFR-Systems oder in der Induktion von CREB oder ERK begründet sein. Die hier vorgelegte Arbeit bildet diesbezüglich die Grundlage hinsichtlich der Wahl der geeigneten Methoden und Zelllinien sowie LPS-Konzentrationen und Bestrahlungsdosen für weiterführende Untersuchungen.

## 7 Summary

Pulmonary infections are frequent complications in patients with NSCLC. The majority of infections is caused by gram-negative germs, with Lipopolysaccharides defining their pathogenicity. The incidence of pneumonia is inversely correlated with prognosis and therapy response of NSCLC. Irradiation is one therapeutic backbone of NSCLC in both curative and palliative settings. Against this background, the effect of LPS on therapy response to irradiation was investigated.

For that purpose, three human non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell lines, A549 (adenocarcinoma), H23 (adenocarcinoma) and H226 (squamous cell carcinoma) were incubated with different concentrations of LPS. Cellular Survival was quantified by three different methods: We investigated clonogenic survival (Colony Assay) of native and irradiated cells (2 Gy and 6 Gy). Moreover, survival was quantified directly by automatic cell counting and indirectly by quantifying the metabolic activity by MTS Assay.

Cellular survival was calculated by the rate of surviving cells after irradiation compared to native cells (Surviving Fraction).

Radiotherapy induced a significant reduction in clonogenic survival in all cell lines, with the most resistant cell line being A549 followed by H226 and finally H23, as the most radiosensitive line when comparing the cell lines as to their radiosensitivity

When comparing the methods applied to quantify radiosensitivity, it was shown that – besides the colony formation assay as the “goldstandard” for quantifying radiosensitivity - direct cell counting was equally appropriate and generated comparable results; however, the surviving fraction tended to be higher than that measured by colony formation assay due to methodical differences. As metabolic activity of irradiated cells remained unchanged after irradiation, the MTS Assay was found not to be adequate to quantify cellular survival after irradiation.

Treatment with LPS did not affect the clonogenic survival of non-irradiated cells, but reduced radiosensitivity in all three cell lines after radiotherapy. Whereas in the A549 and H23 cell lines 10 µg/ml was the most efficient endotoxin concentration to induce radioresistance at radiation doses of 2 and 6 Gy, a significant reduction of radiosensitivity in H226 cells was already observed under LPS concentration of 0,1 µl/ml.

Except for the primarily high radiosensitive cell line H23, displaying a cellular survival of as less as 2-3% when performing colony formation assays after irradiation with 6 Gy, treatment with LPS induced radioresistance in all cell lines as well upon irradiation with 2 Gy or 6 Gy. This LPS-induced radioresistance could be reproduced by automatic cell counting in means of quantity; albeit the effect of irradiation was lower when directly counting cells.

In conclusion, LPS induced a decreased sensitivity of NSCLC cell lines towards radiotherapy. These results suggest that the bacterial infections may be actively involved in the progression of lung cancer by inducing radiotherapy resistance. Possible underlying mechanisms could be the activation of the stimulation of cyclooxygenase and the release of prostanoids, EGFR activation or the upregulation of signaling events like ERK and CREB-activation. This thesis provides a valuable basis as to the selection of adequate methods and cell lines, as well as irradiation- and LPS-doses for further research in this field.



## 8 Abkürzungsverzeichnis

|               |                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------|
| ALK           | ALK receptor tyrosine kinase                           |
| BCG           | Bacillus Calmette-Guérin                               |
| BRAF          | B-raf proto-oncogene                                   |
| CD            | Cluster of differentiation                             |
| COX           | Cyclooxygenase                                         |
| CREB          | cAMP-response-element-binding-protein                  |
| DAMPs         | Danger-associated-molecular-patterns                   |
| DNA           | Desoxyribonucleic acid                                 |
| DSB           | Doppelstrangbruch                                      |
| EGFR          | Epidermal growth factor receptor                       |
| ERK           | Extracellular-signal regulates kinases                 |
| FCS           | Fetal calf serum                                       |
| G-CSF         | Granulocyte-colony-stimulating-factor                  |
| Gy            | Gray                                                   |
| IASLC         | International Association for the study of lung cancer |
| IL            | Interleukin                                            |
| iNOS          | inducible nitric oxide synthase                        |
| LET           | Linearer Energietransfer                               |
| LPS           | Lipopolysaccharid                                      |
| MyD 88        | Myeloid differentiation primary response gene 88       |
| mRNA          | messenger-Ribonucleic acid                             |
| N.            | Nervus                                                 |
| NF $\kappa$ B | Nuclear factor kappa $\beta$                           |
| NHEJ          | Non-homologous-end-joining                             |
| NSCLC         | Non-small-cell-lung-cancer                             |
| MDR           | Multi-Drug-Resistance                                  |
| PAMPs         | Pathogen-associated-molecular-pattern                  |
| PDGF          | Platelet derived growth factor                         |
| PD-1          | Programmed cell death protein 1                        |
| PD-L1         | Programmed death ligand 1                              |
| PE            | Plating efficiency                                     |
| PG            | Prostaglandin                                          |
| PRR           | Pathogen-recognition-receptor                          |
| ROS-1         | ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase         |
| ROS           | Reactive oxygen species                                |

|               |                                                               |
|---------------|---------------------------------------------------------------|
| RT-PCR        | Reverse-transkriptase polymerase chain reaction               |
| SCLC          | Small-cell-lung-cancer                                        |
| TGF- $\beta$  | Transforming-growth-factor $\beta$                            |
| TLR           | Toll-like-receptor                                            |
| TNM           | Tumor, Lymphknoten, Metastasen                                |
| TIR           | Toll/Interleukin Rezeptor                                     |
| TIRAP         | Toll/Interleukin-1 Receptor domain-containing adapter protein |
| TNF- $\alpha$ | Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$                                 |
| TRAM          | TRIF-related adapter molecule                                 |
| TRIF          | TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$    |
| UICC          | Union internationale contre le cancer                         |
| SEM           | Standardabweichung des Mittelwertes                           |
| SF            | Surviving Fraction                                            |
| VEGF          | Vascular endothelial growth factor                            |
| WT            | Wildtyp                                                       |

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|                       |                                                                                                           |    |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 1.1</b>  | Lungenkrebs in Deutschland                                                                                | 1  |
| <b>Abbildung 1.2</b>  | Darstellung des Zellüberlebens mit Hilfe des linear-quadratischen Modells                                 | 14 |
| <b>Abbildung 1.3</b>  | Darstellung des linear-quadratischen Modells.<br>Veranschaulichung der einzelnen Komponenten              | 14 |
| <b>Abbildung 1.4</b>  | Darstellung der LPS-TLR4-Signalkaskade                                                                    | 19 |
| <b>Abbildung 3.1</b>  | Präkonfluente A549-Zellen in Kultur                                                                       | 24 |
| <b>Abbildung 3.2</b>  | Beispiel für einen Koloniebildungstest der Zelllinie A549                                                 | 28 |
| <b>Abbildung 4.1</b>  | Die LPS-Wirkung auf das klonogene Überleben der unbestrahlten Zelllinie A549                              | 33 |
| <b>Abbildung 4.2</b>  | Dosis-Wirkungskurve A549                                                                                  | 34 |
| <b>Abbildung 4.3</b>  | Klonogenes Überleben der Zelllinie A549 in % nach Bestrahlung mit 2 Gy                                    | 35 |
| <b>Abbildung 4.4</b>  | Klonogenes Überleben der Zelllinie A549 in % nach Bestrahlung mit 6 Gy                                    | 36 |
| <b>Abbildung 4.5</b>  | Proliferationsverhalten der mit 6 Gy bestrahlten Zelllinie A549, ausgewertet anhand Zellzählung nach 24 h | 37 |
| <b>Abbildung 4.6</b>  | Prozentuales Überleben der A459 Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy im MTS-Assay nach 24 h                   | 38 |
| <b>Abbildung 4.7</b>  | Die LPS-Wirkung auf das klonogene Überleben der unbestrahlten Zelllinie H23                               | 39 |
| <b>Abbildung 4.8</b>  | Dosis-Wirkungskurve H23                                                                                   | 41 |
| <b>Abbildung 4.9</b>  | Klonogenes Überleben der Zelllinie H23 nach Bestrahlung mit 2 Gy                                          | 42 |
| <b>Abbildung 4.10</b> | Klonogenes Überleben der Zelllinie H23 nach Bestrahlung mit 6 Gy                                          | 42 |
| <b>Abbildung 4.11</b> | Proliferationsverhalten der mit 6 Gy bestrahlten Zelllinie H23, ausgewertet anhand Zellzählung nach 24 h  | 44 |
| <b>Abbildung 4.12</b> | Prozentuales Überleben der H23 Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy im MTS-Assay nach 24 h                    | 45 |
| <b>Abbildung 4.13</b> | Die LPS-Wirkung auf das klonogene Überleben der unbestrahlten Zelllinie H226                              | 45 |

|                       |                                                                                                           |    |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 4.14</b> | Dosis-Wirkungskurve H226                                                                                  | 46 |
| <b>Abbildung 4.15</b> | Klonogenes Überleben der Zelllinie H226 in % nach Bestrahlung mit 2 Gy                                    | 48 |
| <b>Abbildung 4.16</b> | Klonogenes Überleben der Zelllinie H226 in % nach Bestrahlung mit 6 Gy                                    | 48 |
| <b>Abbildung 4.17</b> | Proliferationsverhalten der mit 6 Gy bestrahlten Zelllinie H226, ausgewertet anhand Zellzählung nach 24 h | 49 |
| <b>Tabelle 1.1</b>    | Klassifikation der verschiedenen Lungentumoren                                                            | 5  |
| <b>Tabelle 1.2</b>    | TNM-Klassifikation des Lungenkarzinoms nach den neuen Leitlinien                                          | 6  |
| <b>Tabelle 1.3</b>    | Einteilung des Lungenkarzinoms nach UICC 8                                                                | 10 |
| <b>Tabelle 1.4</b>    | Einteilung des Stadiums IIIA des Lungenkarzinoms nach Robinson                                            | 10 |
| <b>Tabelle 3.1</b>    | Tabellarische Darstellung der drei Zelllinien und ihre wesentlichen Eigenschaften                         | 25 |

## 10 Literaturverzeichnis

- Affolter, A.; Fruth, K.; Brochhausen, C.; Schmidtmann, I.; Mann, WJ.; Brieger, J.** (2011): Activation of mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase in head and neck squamous cell carcinomas after irradiation as part of a rescue mechanism. In: *Head Neck* 33 (10), S. 1448-1457
- Ahmed, KM.; Li, JJ.** (2008): NF-kappa B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. In: *Free Radic Biol Med* 44 (1), S. 1–13.
- Amorino, GP.; Mikkelsen, RB.; Valerie, K.; Schmidt-Ullrich, RK.** (2003): Dominant-negative cAMP-responsive element binding protein inhibits proliferating cell nuclear antigen and DNA repair, leading to increased cellular radiosensitivity. In: *J Biol Chem* 2003; 278: 29394-9
- Aupérin, A.; Le Péchoux, C.; Rolland, E.; Curran, WJ.; Furuse, K; Fournel, P. et al.** (2010): Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. In: *J. Clin. Oncol.* 28 (13), S. 2181–2190.
- Balkwill, F.** (2002): Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13 (2), S. 135–141.
- Balkwill, F.; Mantovani, A.** (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? In: *The Lancet* 357 (9255), S. 539–545.
- Balkwill, F.; Charles, KA.; Mantovani, A.** (2005): Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. In: *Cancer Cell* 7 (3), S. 211–217.
- Ballarini, F.; Altieri, S.; Bortolussi, S.; Carante, M.; Giroletti, E.; Protti, N.** (2014): The BIANCA model/code of radiation-induced cell death: application to human cells exposed to different radiation types. In: *Radiat Environ Biophys.*
- Banchereau, J.; Steinman, R. M.** (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245–252.
- Baskar, R.; Lee, KA.; Yeo, R.; Yeoh, KW.** (2012): Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. In: *Int J Med Sci* 9 (3), S. 193–199.
- Beckles, MA.** (2003): Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer. In: *Chest* 123, S. 97S.
- Bidere, N.; Senik, A.** (2001): Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview. In: *Apoptosis* 6 (5), S. 371–375.
- Born, C.; Kuhn, FP.; Debus, J.** (2006): Radiologie. 104 Tabellen. 2., korr. Aufl. Hg. v. Maximilian Reiser. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Bowie, AG.; Haga, IR.** (2005): The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. In: *Mol. Immunol.* 42 (8), S. 859–867.
- Brach, MA.; Hass, R.; Sherman, ML.; Gunji, H.; Weichselbaum, R.; Kufe, D.** (1991): Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. In: *J Clin Invest* 88 (2), S. 691–695.
- Brahmer, J.; Reckamp, KL.; Baas, P. et al.** (2015): Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2015, 373(2): p. 123-35.
- Brenner, DJ.** (2008): The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction. In: *Semin Radiat Oncol* 18 (4), S. 234–239.

- Bristow, RG.; Benchimol, S.; Hill, RP.** (1996): The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. In: *Radiother Oncol* 40 (3), S. 197–223.
- Brückl, WM.; Wiest, GH.; Ficker, JH.** (2010): Aktueller Stellenwert von Erlotinib und Gefitinib in der palliativen Therapie des NSCLC–welche Bedeutung hat der EGF-R-Mutationsstatus? In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 64 (12), S. 727–735.
- Burdelya, LG.; Krivokrysenko, VI.; Tallant, TC.; Strom, E.; Gleiberman, AS.; Gupta, D. et al.** (2008): An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. In: *Science* 320 (5873), S. 226–230.
- Candido, J.; Hagemann, T.** (2013): Cancer-related inflammation. In: *J. Clin. Immunol.* 33 Suppl 1, S. S79–84.
- Chadwick, KH.; Leenhouts, HP.** (1973): A molecular theory of cell survival. In: *Phys Med Biol* 18 (1), S. 78–87.
- Chen, X.; Shen, B.; Xia, L.; Khaletziy, A.; Chu, D.; Wong, JYC.; Li, JJ.** (2002): Activation of nuclear factor kappaB in radioresistance of TP53-inactive human keratinocytes. In: *Cancer Res* 62 (4), S. 1213–1221.
- Cory, AH.; Owen, TC.; Barltrop, JA.; Cory, JG.** (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. In: *Cancer Commun* 3 (7), S. 207–212.
- D'Auria, F.; Centurione, L.; Centurione, MA; Angelini, A.; Di Pietro, R.** (2017): Regulation of Cancer Cell Responsiveness to Ionizing Radiation Treatment by Cyclic AMP Response Element Binding Nuclear Transcription Factor. In: *Front Oncol* 2017 May 5; 7:76
- Dasika, GK.; Lin, SC.; Zhao, S.; Sung, P.; Tomkinson, A.; Lee, EY.** (1999): DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. In: *Oncogene* 18 (55), S. 7883–7899.
- De, S.; Zhou, H.; DeSantis, D.; Croniger, CM.; Li, X.; Stark, GR** (2015): Erlotinib protects against LPS-induced endotoxicity because TLR 4 needs EGFR to signal. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015 Aug 4; 112(31): 9680–5.
- Debatin, KM.; Krammer, PH.** (2004): Death receptors in chemotherapy and cancer. In: *Oncogene* 23 (16), S. 2950–2966.
- Dikomey, E.; Borgmann, K.; Brammer, I.; Kasten-Pisula, U.** (2003): Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. In: *Toxicology* 193 (1-2), S. 125–135.
- Dittmann, K.; Mayer, C.; Fehrenbacher, B.; Schaller, M.; Raju, U.; Milas, L. et al.** (2005): Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. In: *J Biol Chem* 280 (35), S. 31182–31189.
- Dittmann, KH.; Mayer, C.; Ohneseit, PA.; Raju, U.; Andratschke, NH.; Milas, L.; Rodemann, HP.** (2008): Celecoxib induced tumor cell radiosensitization by inhibiting radiation induced nuclear EGFR transport and DNA-repair: a COX-2 independent mechanism. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70 (1), S. 203–212.
- El-Awady, RA.; Dikomey, E.; Dahm-Daphi, J.** (2003): Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. In: *Br. J. Cancer* 89 (3), S. 593–601.
- Essers, J.; van Steeg, H.; Wit, J. de; Swagemakers, SM.; Vermeij, M.; Hoeijmakers, J. H.; Kanaar, R.** (2000): Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. In: *EMBO J* 19 (7), S. 1703–1710.

- Foray, N.; Monroco, C.; Marples, B.; Hendry, JH.; Fertil, B.; Goodhead, DT. et al.** (1998): Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts is consistent with a continuous spectrum of repair probability. In: *Int J Radiat Biol* 74 (5), S. 551–560.
- Gasparini, G.; Longo, R.; Sarmiento, R.; Morabito, A.** (2003): Inhibitors of cyclooxygenase 2: a new class of anticancer agents? In: *The Lancet Oncology* 4 (10), S. 605–615.
- Gökylidirim, M.; Grandel, U.; Hattar, K. et al** (2018): Targeting CREB-binding protein overrides LPS induced radio-resistance in non-small cell lung cancer cell lines. In: *Oncotarget*, Vol. 9 (No. 48) pp 28976-28988.
- Goeckenjan, G.; Sitter, H.; Thomas, M.; Branscheid, D.; Flentje, M.; Griesinger, F. et al.** (2011): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft–Kurzfassung. In: *Pneumologie* 65 (8), S. e51-75.
- Gribar, SC.; Richardson, WM.; Sodhi, CP.; Hackam, DJ.** (2008): No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. In: *Mol. Med.* 14 (9-10), S. 645–659.
- Guo, S.; Sonenshein, GE.** (2004): Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. In: *Mol Cell Biol* 24 (19), S. 8681–8690.
- Hanson, WR.; Ainsworth, EJ.** (1985): 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 induces radioprotection in murine intestinal and hematopoietic stem cells. In: *Radiat Res* 103 (2), S. 196–203.
- Hattar, K.; Savai, R.; Subtil, FSB.; Wilhelm, J.; Schmall, A.; Lang, DS. et al.** (2013): Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. In: *Cancer Immunol. Immunother.* 62 (2), S. 309–320.
- He, W.; Liu, Q.; Wang, L.; Chen, W.; Li, N.; Cao, X.** (2007): TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. In: *Mol. Immunol.* 44 (11), S. 2850–2859.
- Herbst, RS.; Heymach, JV.; Lippman, SM.** (2008): Lung cancer. In: *The New England journal of medicine* 359 (13), S. 1367–1380.
- Herbst, RS.; Sandler, A.** (2008): Bevacizumab and erlotinib: a promising new approach to the treatment of advanced NSCLC. In: *The Oncologist* 13 (11), S. 1166–1176.
- Herrmann, T.; Baumann, M.; Dörr, W.** (2006): Klinische Strahlenbiologie. Kurz und bündig. 4., völlig überarb. Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
- Herscher, LL.; Cook, JA.; Pacelli, R.; Pass, HI.; Russo, A.; Mitchell, JB.** (1999): Principles of chemoradiation: theoretical and practical considerations. In: *Oncology (Williston Park)* 13 (10 Suppl 5), S. 11–22.
- Hyde, L. and Hyde, Cl.** (1974): Clinical manifestations of lung cancer. In: *Chest* (1974); 65: 229-306.
- Iliakis, G.** (1991): The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. In: *Bioessays* 13 (12), S. 641–648.
- Jackman, DM.; Miller, VA.; Cioffredi, LA.; Yeap, BY.; Jänne, PA.; Riely, GJ. et al.** (2009): Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. In: *Clin. Cancer Res.* 15 (16), S. 5267–5273.

**Johnstone, RW.; Ruefli, AA.; Lowe, SW.** (2002): Apoptosis. In: *Cell* 108 (2), S. 153–164.

**Kerr, JF.; Wyllie, AH.; Currie, AR.** (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *Br J Cancer* 26 (4), S. 239–257.

**Kiltie, AE.; Orton, C.J.; Ryan, A.J.; Roberts, SA.; Marples, B.; Davidson, SE.** et al. (1997): A correlation between residual DNA double-strand breaks and clonogenic measurements of radiosensitivity in fibroblasts from preradiotherapy cervix cancer patients. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39 (5), S. 1137–1144.

**Kluwe, J.; Mencin, A.; Schwabe, RF.** (2009): Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. In: *J. Mol. Med.* 87 (2), S. 125–138.

**Kopp, EB.; Medzhitov, R.** (1999): The Toll-receptor family and control of innate immunity. In: *Current Opinion in Immunology* 11 (1), S. 13–18.

**Lee, CH.; Jeon, YT.; Kim, SH.; Song, YS.** (2007): NFkB as a potential molecular target for cancer therapy. In: *Biofactors* 2007; 29(1): 19-35.

**Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):** Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 0.1, 2018, AWMF-Registernummer: 020/007OL <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>

**Leroy, B.; Girard, L.; Hollestelle, A.; Minna, JD.; Gazdar, AF.; Soussi, T.** (2014): Analysis of TP53 Mutation Status in Human Cancer Cell Lines: A Reassessment. In: *Hum Mutat.* 2014 Jun; 35(6):756-65

**Liao, EC.; Hsu, YT.; Chuah, QY.; Lee, YJ.; Hu, JY.; Huang, TC.** et al. (2014): Radiation induces senescence and a bystander effect through metabolic alterations. In: *Cell death & disease* 5, S. e1255.

**Liauw, SL.; Connell, PP.; Weichselbaum, RR.** (2013): New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. In: *Sci Transl Med* 5 (173), S. 173.

**Liu, C.; Zhang, C.; Mitchel, REJ; Cui, J.; Lin, J.; Yang, Y.** et al. (2013): A critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) and its' in vivo ligands in basal radio-resistance. In: *Cell Death Dis* 4, S. e649.

**Lotze, MT.; Zeh, HJ.; Rubartelli, A.; Sparvero, LJ.; Amoscato, AA.; Washburn, NR.** et al. (2007): The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. In: *Immunol Rev* 220, S. 60–81.

**Lu, YC.; Yeh, WC.; Ohashi, PS.** (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. In: *Cytokine* 42 (2), S. 145–151.

**Malaise EP.; Fertil B.; Chavaudra N.; Guichard M.** (1986): Distribution of radiation sensitivities for human tumor cells of specific histological types: comparison of in vitro and in vivo data. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986 Apr; 12(4): 617-24

**Malich, G.; Markovic, B.; Winder, C.** (1997): The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. In: *Toxicology* 124 (3), S. 179–192.

**Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F.** (2008): Cancer-related inflammation. In: *Nature* 454 (7203), S. 436–444.

**Martin, NT.; Nakamura, K.; Paila, U.; Woo, J.; Brown, C.; Wright, JA.** et al. (2014): Homozygous mutation of MTPAP causes cellular radiosensitivity and persistent DNA double-strand breaks. In: *Cell Death Dis* 5, S. e1130.



- McLemore, TL.; Hubbard, WC.; Litterst, CL.; Liu, MC.; Miller, S.; McMahon, NA.** et al. (1988): Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients. In: *Cancer Res* 48 (11), S. 3140–3147.
- Milas, L.; Mason, KA.; Crane, CH.; Liao, Z.; Masferrer, J.** (2003): Improvement of radiotherapy or chemoradiotherapy by targeting COX-2 enzyme. In: *Oncology (Williston Park)* 17 (5 Suppl 5), S. 15–24.
- Mirzayans, R.; Andrais, B.; Scott, A.; Wang, YW.; Murray, D.** (2013): Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. In: *Int J Mol Sci* 14 (11), S. 22409–22435.
- Moding, EJ.; Kastan, MB.; Kirsch, DG.** (2013): Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. In: *Nat Rev Drug Discov* 12 (7), S. 526–542.
- Mok, TS.; Wu, YL.; Thongprasert, S.; Yang, CH.; Chu, DT.; Saijo, N.** et al. (2009): Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. In: *The New England journal of medicine* 361 (10), S. 947–957.
- Nahas, SA.; Gatti, RA.** (2009): DNA double strand break repair defects, primary immunodeficiency disorders, and 'radiosensitivity'. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9 (6), S. 510–516.
- Neta, R.; Oppenheim, JJ.; Schreiber, RD.; Chizzonite, R.; Ledney, GD.; MacVittie, T.J.** (1991): Role of cytokines (interleukin 1, tumor necrosis factor, and transforming growth factor beta) in natural and lipopolysaccharide-enhanced radioresistance. In: *J Exp Med* 173 (5), S. 1177–1182.
- Niederberger, E.; Manderscheid, C.; Grösch, S.; Schmidt, H.; Ehnert, C.; Geisslinger, G.** (2004): Effects of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib on human vascular cells. In: *Biochem. Pharmacol.* 68 (2), S. 341–350.
- Orlowski, RZ.; Baldwin, AS. Jr** (2002): NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. In: *Trends Mol Med* 8 (8), S. 385–389.
- O'Rourke, N.; Macbeth, F.** (2010): Is concurrent chemoradiation the standard of care for locally advanced non-small cell lung cancer? A review of guidelines and evidence. In: *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22 (5), S. 347–355.
- O'Rourke, N.; Roqué I Figuls, M.; Farré Bernadó, N.; Macbeth, F.** (2010): Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. In: *Cochrane Database Syst Rev* (6), S. CD002140.
- Orth, M.; Lauber, K.; Niyazi, M.; Friedl, AA.; Li, M.; Maihöfer, C.** et al. (2014): Current concepts in clinical radiation oncology. In: *Radiat Environ Biophys* 53 (1), S. 1–29.
- Pajonk, F.; Vlashi, E.; McBride, WH.** (2010): Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. In: *Stem Cells* 28 (4), S. 639–648.
- Pardoll, DM.; Drake C.** (2012): Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. In: *J Exp Med* (2012), 209: 201–209.
- Park, K.; Tan, EH.; O'Byrne, K.** et al. (2016): Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomized controlled trial. In: *Lancet Oncol* (2016) May; 17(5): 577–89.
- Pawlik, TM.; Keyomarsi, K.** (2004): Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59 (4), S. 928–942.
- Perlin, E.; Bang, K. M.; Shah, A.; Hursey, P. D.; Whittingham, W. L.; Hashmi, K.** et al. (1990): The impact of pulmonary infections on the survival of lung cancer patients. In: *Cancer* 66 (3), S. 593–596.

- Perry, AK.; Chen, G.; Zheng, D.; Tang, H.; Cheng, G.** (2005): The host type I interferon response to viral and bacterial infections. In: *Cell Res.* 15 (6), S. 407–422.
- PORT Meta-analysis Trialists Group** (2005): Postoperative radiotherapy for non-small cell lung cancer. In: *Cochrane Database Syst Rev* (2), S. CD002142.
- Provencio, M.; Sánchez, A.** (2014): Therapeutic integration of new molecule-targeted therapies with radiotherapy in lung cancer. In: *Translational lung cancer research* 3 (2), S. 89–94.
- Puck, TT.; Marcus, PI.** (1956): Action of x-rays on mammalian cells. In: *J Exp Med* 103 (5), S. 653–666.
- Putinati, S.; Trevisani, L.; Gualandi, M.; Guerra, G.; Rossi, M. R.; Sartori, S.; Potena, A.** (1994): Pulmonary infections in lung cancer patients at diagnosis. In: *Lung Cancer* 11 (3–4), S. 243–249.
- Rai, Y.; Pathak, R.; Kumari, N.; Sah, DK.; Pandey, S.** et al. (2018): Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. In: *Sci Rep* 2018 Jan 24; 8(1): 1531
- Raju SC., Hauff SJ., Lemieux AJ., Orosko RK.** et al (2015): Combined TP 53 mutation/3p loss correlates with decreased radiosensitivity and increased matrix-metalloproteinase activity in head and neck carcinoma. In: *Oral Oncol* 2015 May; 51 (5): 470-5.
- Rakoff-Nahoum, S.; Medzhitov, R.** (2008): Toll-like receptors and cancer. In: *Nat Rev Cancer* 9 (1), S. 57–63.
- Reck, M.; Kaiser, R.; Mellemaard, A.** et al. (2014): Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previous treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. In: *Lancet Oncol* 15(2): p 143-55.
- Reck, M.; Rodriguez-Abreu, D.** et al. (2016): Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *N Engl J Med*, 375: 1823-1833.
- Riehl, TE.; Newberry, RD.; Lorenz, RG.; Stenson, WF.** (2004): TNFR1 mediates the radioprotective effects of lipopolysaccharide in the mouse intestine. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286 (1), S. G166-73.
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).** Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe. Berlin 2013.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).** Krebs in Deutschland 2013/2014, 11. Ausgabe. Berlin 2017.
- Robinson, LA.** et al. (2003): Treatment of stage IIIA non-small cell lung cancer. In: *Chest.* 2003. 123 (1 Suppl): p. 202S-220S.
- Roos, WP.; Binder, A.; Bohm, L.** (2000): Determination of the initial DNA damage and residual DNA damage remaining after 12 hours of repair in eleven cell lines at low doses of irradiation. In: *Int J Radiat Biol* 76 (11), S. 1493–1500.
- Rudner, J.; Belka, C.; Marini, P.; Wagner, R. J.; Faltin, H.; Lepple-Wienhues, A.** et al. (2001): Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells. In: *Int J Radiat Biol* 77 (1), S. 1–11.
- Ruiz de Almodovar, JM.; Nunez, MI.; McMillan, TJ.; Olea, N.; Mort, C.; Villalobos, M.** et al. (1994): Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. In: *Br J Cancer* 69 (3), S. 457–462.

- Saadeddin, A.** (2012): Radiotherapy for NSCLC: review of conventional and new treatment techniques. In: *Journal of infection and public health* 5 Suppl 1, S. S45-9.
- Sabin, RJ.; Anderson, RM.** (2011): Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. In: *Genome integrity* 2 (1), S. 7.
- Sandler, A.; Gray, R.; Perry, MC.; Brahmer, J.; Schiller, JH.; Dowlati, A. et al.** (2006): Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. In: *N Engl J Med* 355 (24), S. 2542–2550.
- Sato, Y.; Goto, Y.; Narita, N.; Hoon, DSB.** (2009): Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. In: *Cancer Microenviron* 2 Suppl 1, S. 205–214.
- Scagliotti, G.** (2001): Symptoms, Signs and Staging of lung cancer. In: *Eur Respir Mon.* 2001; 17: 86-119
- Scheidegger, S.; Fuchs, HU.; Zaugg, K.; Bodis, S.; Füsichlin, RM.** (2013): Using state variables to model the response of tumour cells to radiation and heat: a novel multi-hit-repair approach. In: *Comput Math Methods Med* 2013, S. 587543.
- Schletter J., Heine H., Ulmer AJ., Rietschel ET.** (1995): Molecular mechanisms of endotoxin activity. In: *Arch Microbiol* 1995 Dec; 164 (6): 383-9.
- Sittampalam, GS.; Gal-Edd, N.; Arkin, M.; Auld, D.; Austin, C.; Bejcek, B. et al.** (2013): Cell Viability Assays. Unter Mitarbeit von Terry L. Riss, Richard A. Moravec, Andrew L. Niles, Helene A. Benink, Tracy J. Worzella und Lisa Minor. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>, zuletzt aktualisiert am 01.05.2013, zuletzt geprüft am 06.03.2014.
- Song, Z.; Zhang, Y.** (2015): Efficacy of gefitinib or erlotinib in patients with squamous cell lung cancer. In: *Arch Med Sci* 11 (1), S. 164–168.
- Soria, JC.; Ohe, Y. et al.** (2018): Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *N Engl J Med* (2018) Jan 11; 378(2): 113-125.
- Spiro SG., Colice GL., American College of Chest Physicians** (2007): Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer: Symptoms, Signs, Laboratory Tests and Paraneoplastic Syndroms. In: *Chest* 132 (3 Suppl), 149S-160S.
- Statistisches Bundesamt (Destatis):** Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2015, zuletzt geprüft am 10.03.2017.
- Tadros, EM.; Frank, N.** (2012): Effects of continuous or intermittent lipopolysaccharide administration for 48 hours on the systemic inflammatory response in horses. In: *American journal of veterinary research* 73 (9), S. 1394–1402.
- Takahashi, T.; Nau, MM.; Chiba, I.; Birrer, MJ.; Rosenberg, RK.; Vinocour, M. et al.** (1989): p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. In: *Science* 246 (4929), S. 491–494.
- Thatcher, N.; Hirsch, FR.; Luft, AV. et al.** (2015): Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line-therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomized, controlled phase 3 trial. In: *Lancet Oncol*, 2015, 16(7): p. 763-74
- Thomlinson, RH.; Gray, LH.** (1955): The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy. In: *Br J Cancer* 9 (4), S. 539–549.

**Tilborgh, S.; Corthouts, J.; Verhoeven, Y.** et al. (2017): The role of Nuclear Factor-Kappa B signaling in human cervical cancer. In: *Crit Rev Oncol Hematol* 2017 Dec; 120: 141-150.

**Tobias, PS.; Soldau, K.; Ulevitch, R.J.** (1986): Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. In: *J Exp Med* 164 (3), S. 777–793.

**Todd, DG.; Mikkelsen, RB.; Rorrer, WK.; Valerie, K.; Schmidt-Ullrich, RK.** (1999): Ionizing radiation stimulates existing signal transduction pathways involving the activation of epidermal growth factor receptor and ERBB-3, and changes of intracellular calcium in A431 human squamous carcinoma cells. In: *J Recept Signal Transduct Res* 19 (6), S. 885–908.

**Toulany, M.; Dittmann, K.; Krüger, M.; Baumann, M.; Rodemann, HP.** (2005): Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. In: *Radiother Oncol* 76 (2), S. 143–150.

**Toulany, M.; Kasten-Pisula, U.; Brammer, I.; Wang, S.; Chen, J.; Dittmann, K.** et al. (2006): Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. In: *Clin Cancer Res* 12 (13), S. 4119–4126.

**Travis WD., Brambilla E., Nicholson AG., Yatabe Y., Austin JHM.** et al. (2015): The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. In: *J Thoracic Oncol* 2015 Sep; 10(9): 1243-1260.

**Tsan, MF.** (2006): Toll-like receptors, inflammation and cancer. In: *Semin. Cancer Biol.* 16 (1), S. 32–37.

**Tsutsumi, S.; Tada, T.; Maekado, T.; Tokunaga, M.; Tanaka, N.; Kobayashi, A.** et al. (2014): Lung cancer: a 6-field technique using lateral beams in conformal radiotherapy for bilateral supraclavicular lymph node metastases. In: *SpringerPlus* 3, S. 733.

**Valenzuela, DM.; Groffen, J.** (1986): Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. In: *Nucleic Acids Res* 14 (2), S. 843–852.

**Vigano, S., Perreau, M., Pantaleo, G., Harari, A.** (2012): Positive and negative regulation of cellular immune response in physiologic conditions and diseases. In: *Clin Dev Immunol.* (2012), 2012:485781

**Vogelmann, R.; Amieva, MR.** (2007): The role of bacterial pathogens in cancer. In: *Curr. Opin. Microbiol.* 10 (1), S. 76–81.

**Walden, TL. Jr; Farzaneh, NK.** (1995): Radioprotection by 16,16 dimethyl prostaglandin E2 is equally effective in male and female mice. In: *J Radiat Res* 36 (1), S. 1–7.

**Wang, H.; Zeng, ZC.; Bui, TA.; Sonoda, E.; Takata, M.; Takeda, S.; Iliakis, G.** (2001): Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. In: *Oncogene* 20 (18), S. 2212–2224.

**Wang, L.; Zhu, R.; Huang, Z.; Li, H.; Zhu, H.** (2013): Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling in cancer cells promotes cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma. In: *Dig. Dis. Sci.* 58 (8), S. 2223–2236.

**Wang, M.; Han, J.; Marcar, L.; Black, L.; Liu, Q.; Li, X.; Nagulapalli, K.** et al. (2017): Radiation Resistance in KRAS-Mutated Lung Cancer Is Enabled by Stem-like Properties Mediated by an Osteopontin-EGFR Pathway. In: *Cancer Res.* 2017 Apr 15; 77(8):2018-2028.

- Weber, KJ.; Wenz, F.** (2002): p53, apoptosis and radiosensitivity--experimental and clinical data. In: *Onkologie* 25 (2), S. 136–141.
- Wei, R.; Zhang, Y.; Shen, L.; Jiang, W.; Li, C.; Zhong, M.** et al. (2012): Comparative proteomic and radiobiological analyses in human lung adenocarcinoma cells. In: *Mol. Cell. Biochem.* 359 (1-2), S. 151–159.
- Williams, JR.; Zhang, Y.; Zhou, H.; Gridley, DS.; Koch, CJ.; Russell, J.** et al. (2008): A quantitative overview of radiosensitivity of human tumor cells across histological type and TP53 status. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 84 (4), S. 253–264.
- Withers, HR.** (1975): Four R's of radiotherapy. In: *Advances in Radiation Biology* 1975, S. 241-247
- Withers, HR.; Maciejewski, B.; Taylor, JM.; Hliniak, A.** (1988): Accelerated repopulation in head and neck cancer. In: *Front Radiat Ther Oncol* 22, S. 105–110.
- Wright, SD.; Ramos, RA.; Tobias, PS.; Ulevitch, RJ.; Mathison, JC.** (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. In: *Science* 249 (4975), S. 1431–1433.
- Wright, SD.; Tobias, PS.; Ulevitch, RJ.; Ramos, RA.** (1989): Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. In: *J Exp Med* 170 (4), S. 1231–1241.
- Xie, H.; Rath, NC.; Huff, GR.; Huff, WE.; Balog, JM.** (2000): Effects of Salmonella typhimurium lipopolysaccharide on broiler chickens. In: *Poultry science* 79 (1), S. 33–40.
- Zhang, X.; Cao, P.** (2010): [Infection in patients with malignant tumors]. In: *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 35 (11), S. 1183–1188.
- Zhang, YB.; He, FL.; Fang, M.; Hua, TF.; Hu, BD.; Zhang, ZH.** et al. (2009): Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. In: *Mol. Biol. Rep.* 36 (6), S. 1475–1481.
- Zheng, DJ.; Yu, GH.; Gao, JF.; Gu, JD.** (2013): Concomitant EGFR inhibitors combined with radiation for treatment of non-small cell lung carcinoma. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 14 (8), S. 4485–4494.
- Zheng, Y.; Ritzenthaler, JD.; Sun, XJ.; Roman, J.; Han, SW.** (2009): Prostaglandin E2 stimulates human lung carcinoma cell growth through induction of integrin-linked kinase: the involvement of EP4 and Sp1. In: *Cancer Res.* 69 (3), S. 896–904.
- Zips, D.; Adam, M.; Flentje, M.; Haase, A.; Molls, M.; Mueller-Klieser, W.** et al. (2004): Impact of hypoxia and the metabolic microenvironment on radiotherapy of solid tumors. Introduction of a multi-institutional research project. In: *Strahlenther Onkol* 180 (10), S. 609–615.
- Zou, W.** (2005): Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. In: *Nat. Rev. Cancer* 5 (4), S. 263-274.

## 11 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Doktorarbeit wurden in den folgenden Präsentationen und Veröffentlichungen verwendet:

**Posterpräsentation** UGMLC/DZL-Symposium 2012 in Marburg:

**Schütz, E.** Grandel, U; Baier, D; Kamlah, F; Savai, R; Schmall, A; Dahlem, G; Sibelius, U; Seeger, W; Grimminger, F; Hattar, K: *The effect of endotoxin on cell-proliferation and responsiveness to treatment in non small cell lung cancer.*

**Posterpräsentation** DGIM-Kongress (Schwerpunkt Pneumologie) 2012 in Wiesbaden

**(Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V.)**

**Schütz, E.** Baier, D; Kamlah, F; Savai, R; Schmall, A, Dahlem, G; Grandel, U; Sibelius, U; Seeger, W; Grimminger, F; Hatter, K: *Die Wirkung von Endotoxin auf Proliferation und Therapieansprache im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom.* Der Internist 2012; 53: Supplement 1, PS 116; Posterpreis Pneumologie

**Posterpräsentation** DGIM-Kongress (Schwerpunkt Onkologie) 2011 in Wiesbaden

**Schütz, E.** Savai, R; Schmall, A, Dahlem, G; Grandel, U; Sibelius, U; Seeger, W; Grimminger, F; Hatter, K: *Endotoxin induziert die Proliferation und Strahlenresistenz von NSCLC-Zellen.*

**Veröffentlichung:**

Gökyildirim, MY; Grandel, U; Hattar, K; Dahlem, G; **Schuetz, E.** Leinberger, FH; Eberle, F; Sibelius, U; Grimminger, F; Seeger, W; Engenhardt-Cabillic, R; Dikomey, E; Subtil, FSB: *Targeting CREB-binding protein overrides LPS induced radio-resistance in non-small cell lung cancer cell lines.* Oncotarget 2018; Vol. 9 (No. 48); pp 28976-28988.

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus – Liebig - Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt

der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.



Gießen, 08.04.2020

Unterschrift

### 13 Danksagung

Zunächst gilt ein besonders großer Dank Herrn Prof. Dr. Ulrich Grandel und Frau Dr. Katja Hattar für die Überlassung des Dissertationsthemas und die sehr gute Betreuung über all die Jahre. Insbesondere bei Frau Dr. Katja Hattar möchte ich mich für die vielen Stunden, die Diskussionen, das Korrekturlesen und die Geduld bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Gabriele Dahlem für die Hilfe im Labor und bei Versuchsdurchführung und -auswertung bedanken. Den Kollegen der Klinik für Strahlentherapie unter der Leitung von Frau Prof. Engenhardt-Cabillic, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Peter Lewe-Schlosser danke ich für die ebenfalls gute Betreuung und für die vielen „physikalischen“ Erklärungen. Ohne die unkomplizierten Terminvereinbarungen zur Bestrahlung der Zellen wäre die Durchführung der Arbeit sicher nicht möglich gewesen. Danke dafür.

Frau Dr. Florentine Subtil gilt ein großes Dankeschön für ihre Hilfestellung in strahlentherapeutischen Fragen.

Prof. Ulf Sibelius und Prof. Friedrich Grimminger danke ich herzlich für die finanziellen Mittel sowie die Räumlichkeiten.

Ich bedanke mich bei meinen Mitdoktoranden für die vielen schönen Stunden im Labor, für die gegenseitigen Hilfestellungen und den Zusammenhalt.

Abschließend gilt ein besonders großer Dank meinen Eltern. Vielen Dank für die großartige Unterstützung, ohne die weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die Motivationsanstöße und den Glauben an mich und die Fertigstellung dieser Arbeit.

Jedrzej Hoffmann danke ich für die großartige Unterstützung und Motivation über die letzten Jahre und beim Finalisieren der Dissertation. Vielen Dank für das Korrekturlesen, die Geduld und die ein oder andere konstruktive Kritik.



## **14 Lebenslauf**

***Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.***



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6857-8



9 1783835 1968578